

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

**MATÜR TAVŞANLARDA TAM KAT EKLEM KIKIRDAK
DEFEKTLERİNİN İYİLEŞMESİNDE TROMBOSİT KÖKENLİ
BÜYÜME FAKTÖRÜNÜN ROLÜ**

**Dr. Hasan TABUR
Uzmanlık Tezi**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Sezgin SARBAN**

**ŞANLIURFA
2007**

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

**MATÜR TAVŞANLARDA TAM KAT EKLEM KIKIRDAK
DEFEKTLERİNİN İYİLEŞMESİNDE TROMBOSİT KÖKENLİ
BÜYÜME FAKTÖRÜNÜN ROLÜ**

Dr. Hasan TABUR
Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Sezgin Sarban

ŞANLIURFA
2007

**HARRAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA**

Dr.Hasan TABUR'un hazırladığı "Matür Tavşanlarda Tam Kat Eklem Kıkırdak Defektlerinin iyileşmesinde Trombosit Kökenli Büyüme Faktörünün Rolü" başlıklı tezi 09.04.2007 tarihinde jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek **Ortopedi ve Travmatoloji** Anabilim Dalında Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Doç.Dr.Sezgin SARBAN
Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı Başkan V.



ÜYE

Doç.Dr.Mustafa CENGİZ
Anesteziyoloji ve Rean. AD. Başkanı



ÜYE

Doç.Dr.Ayhan VERİT
Üroloji Anabilim Dalı



ÜYE

Yrd.Doç.Dr.Alparslan TERZİ
Genel Cerrahi Anabilim Dalı



ÜYE

Yrd.Doç.Dr.Özlem ALTINDAĞ
Fizik Tedavi ve Reh. Anabilim Dalı



ONAY

Prof. Dr. Ahmet KOÇ
Tıp Fak. Dekan Yrd.

DEKAN

TEŞEKKÜR

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak çalıştığım sürece, desteğini esirgemeyen, beni teşvik edip yönlendiren, bilgi ve deneyimleriyle eğitimime, uzmanlık tezimin konusunun seçimine ve hazırlanmasına yaptıkları katkılarından dolayı danışman hocam Doç. Dr. Sezgin SARBAN'a, yaptığım çalışmalarında her zaman destek, ilgi ve anlayışını gördüğüm, yetişmemde katkıları olan hocam Prof. Dr. U. Erdem IŞIKAN'a teşekkür ederim.

Çalışmamın yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç.Dr. Füsun BABA'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak, çalışmamda bana maddi olarak katkı sağlayan HÜBAK'a (Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Geliştirme Vakfı) ve varlıkları ile bana güç ve destek veren, bu çalışmam ve uzmanlık eğitimim boyunca yardımlarını eksik etmeyen, eşime, ayrıca ihtisasım süresince birlikte çalıştığım değerli asistan arkadaşlarıma, tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

2007 Şanlıurfa

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1-2
2. GENEL BİLGİLER	3-30
3. MATERYAL- METOD	31-34
4. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME	35-37
5. BULGULAR	38-48
6. TARTIŞMA	49-57
7. SONUÇ	58
8. KAYNAKLAR	59-70

TABLO LİSTESİ

Tablo		Sayfa
I	Eklem kıkırdağı matriksinin yapısal makromolekülleri.	11
II	İskelet sistemi ile ilgili başlıca büyüme faktörleri	23
III	Modifiye histolojik değerlendirme skalası	37
IV	Çalışmadaki üç grubun istatistiksel olarak karşılaştırılması.	42

RESİM LİSTESİ

Resim		Sayfa
1	Normal eklem kıkırdağının histolojik görünümü	4
2	Kıkırdak katmanlarının hücre su kollajen ve PG içeriğinin dağılımı	5
3	Eklem kıkırdağının kollajen fibrille kuvvetlendirilen solid matriksinin moleküler organizasyonu.	10
4	Cerrahi teknik diz eklemine makroskopik görüntüsü	33
5	Cerrahi teknik diz eklemine makroskopik görüntüsü –defekt oluşturulması.	33
6	Kollajen tip-I (Ativene)	34
7	PDGF (Sigma)	34
8	Kontrol grubunun (A) makroskopik görüntüsü	39
9	Kollajen süngerle doldurulan grubun (B) makroskopik görüntüsü	39
10	PDGF emdirilmiş Kollajen süngerle doldurulan grubun (C) makroskopik görüntüsü	40
11	A grubu HE boyama mikroskobik görüntüsü	43
12	B grubu HE boyama mikroskobik görüntüsü	44
13	C grubu HE boyama mikroskobik görüntüsü (iki nolu denek)	44
14	C grubu HE boyama mikroskobik görüntüsü (bir nolu denek)	45
15	A grubu Toluidin blue boyama mikroskobik görüntüsü	45
16	B grubu Toluidin blue boyama mikroskobik görüntüsü	46
17	C grubu Toluidin blue boyama mikroskobik görüntüsü	46
18	A grubu tip-II kollajen boyası ile immunohistokimyasal boyama mikroskobik görüntüsü	47
19	B grubu tip-II kollajen boyası ile immunohistokimyasal boyama mikroskobik görüntüsü	47
20	C grubu tip-II kollajen boyası ile immunohistokimyasal boyama mikroskobik görüntüsü	48

SİMGELER ve KISALTMALAR

PDGF	Trombosit kökenli büyüme faktörü
IGF	İnsuline like growth factor
FGF	Fibroblast growth factor
rhBMP-2	Recombinant human bone morfogolik protein
PTH	Paratiroid hormon
TGF- β	Transforming growth factor- β
PG	Prostaglandin
IL-1	İnterlökin-1
dk	Dakika
SZP	Süperfacial zone protein
COMP	Cartilage oligomericprotein
TIMP	Tissue-induced metalloproteinase inhibitors
CDI	Cartilage-derived inhibitor
GH	Growth Hormon
HE	Hemotoksilen eosin
MSA	Multiplication stimulating activity
TNF- α	Tümör Nekroz Faktörü - Alfa
EGF	Epidermal growth factor
TB	Toluidin blue
h	Saat
IgG	İmmünglobulin G
Ort	Aritmetik ortalama
SS	Standart sapma
im	İntra muskuler
iv	İntra venöz
ark.	arkadaşları
kg	Kilogram
HGF	'Hepatocyte Growth Factor
PCNA	Proliferating cell nucleer antigen

GİRİŞ VE AMAÇ

Eklem kıkırdağı deforme edici kuvvetlere karşı direnç gösteren karmaşık bir dokudur. Bu yapının osteoartrit ve travma gibi nedenlerle hasarı milyonlarca insanı etkileyen yaygın bir problemdir. Tam kat hasarında dokunun kendi kendini onarma kapasitesi oldukça sınırlıdır. Hasarın iyileşmesinde temel sorun, orijinal eklem kıkırdağı dokusuna uygun, dayanıklı bir kıkırdak elde edilmesinde karşılaşılan ciddi güçlüklerdir. İyileşme, oynar eklemlerdeki hyalin kıkırdak yerine fibröz kıkırdak ile olmakta ve bu tamir dokusu hyalin kıkırdağa göre biyomekanik olarak daha az dirençli ve çok kısa ömürlü olmaktadır (35).

Kanlanma ve iyileşme potansiyeli iyi olmayan bu dokunun onarımına yardımcı yöntemler, klinik ve deneysel olarak birçok çalışmanın konusu olmuştur. Bunlardan; eklem debridmanı, otojen periost greftleri ile onarım, otolog kondrosit transplantasyonu, mikrokirik oluşturulması, sitokinlerin etkilerinin azaltılması, osteokondral otogreft-allogreftler, demineralize kemik matriksi ve büyüme faktörleri uygulamaları gibi yöntemler birçok çalışmada araştırılmıştır (8, 34, 44, 58, 81, 82, 93).

Tip I kollajen süngerine emdirilmiş rekombinant insan kaynaklı kemik morfojenik protein (rhBMP-2), insulin benzeri büyüme faktörü (IGF-I), fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi büyüme faktörleri ile yapılan tam kat kıkırdak defekti onarımlarında asıl amaç; hyalin kıkırdak içinde daha yoğun bulunan Tip-II kollajen oranını artırarak oluşan kıkırdağın mekanik dayanıklılığını artırmaktır. Birçok çalışmada adı geçen büyüme faktörlerinin tip II kollajen oranını değişen oranlarda artırdığı saptanmıştır (20, 34, 81, 82, 93). Fibroblastlar, osteoblastlar ve kondrositleri içeren mezenkimal orijinli hücreler için potent bir mitojenik ve kemotaktik faktör olan “Trombosit kökenli büyüme faktörü” (PDGF)’nün lokal uygulanmasının

eklem kıkırdak hasarı üzerine etkilerini içeren çalışma yoktur. Biz bu çalışmada, tam kat osteokondral defektlerin onarımında hasarlı kondrositlerde potent bir mitojenik ve kemotaktik faktör olduğu bilinen PDGF'nün kıkırdak onarımı sürecine lokal etkilerini araştırmayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

EKLEM KIKIRDAĞI

Normal eklem kıkırdağı hyalin kıkırdak yapısındadır. Diğer destek doku tiplerinden ayrı olarak eklem kıkırdağı sinir ucu ve kan damarları içermez. Eklem kıkırdağını oluşturan hyalin kıkırdak esnek ve elastiki yapıda, mavimsi beyaz, sedefi renkte bir görünüme sahiptir (15, 16, 18, 101). Altındaki subkondral kemiği koruyan biyomekanik fonksiyonu, hyalin kıkırdağın biyokimyasal ve histolojik yapısı sayesinde (44). Yetişkin eklem kıkırdağı histolojik olarak dört horizontal tabakaya ayrılır (Resim 1). Bu tabakaların hücre tipleri ve moleküler bileşimleri farklıdır. Bu tabakalar arasındaki morfolojik, biyokimyasal ve fonksiyonel farklılıklar eklem yüzeyinden olan derinliğe bağlıdır (22, 59);

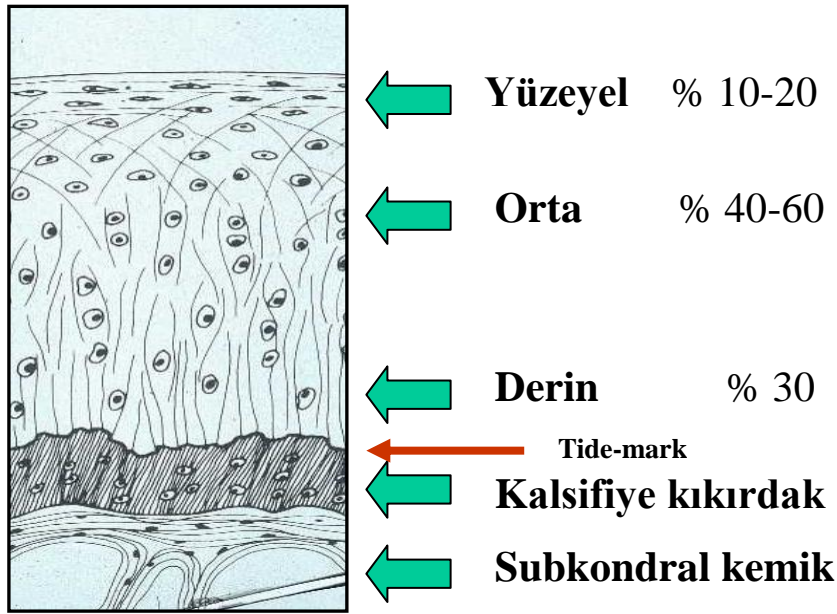
1-Yüzeyel tabaka (superficial zone): Yüzeyel tabaka bir ile üç kat yassı hücre içerir. Bu hücreler bütün eklem kıkırdağı hücrelerinin %10'udur. Hücreler kendi ekstrasellüler matriks proteinlerini üretebilirler. Eklemde bazal membran olmadığından yüzeyel tabaka bazal membranla eşdeğerdir. Kıkırdağı çevre dokulardan ve vücut sıvılarından ayırır. Yüzeyel tabaka hücreleri irritasyona hassastır ve inlerlöklin-1 (IL-1)'e güçlü yanıt verir (22, 59).

2-Orta ve derin tabaka (middle and deep zone): Bu tabakalar sferik yapıdaki eklem kondrositlerinden ve etrafını çevreleyen matriksten oluşur. Bu hücreler eklem kıkırdağının %80'inden fazlasını meydana getirir. Derin tabakadaki kondrositler; kollajenler, proteoglikanlar, glikoproteinler, hyaluronan ve indirgeyici enzimler gibi ekstrasellüler matriks komponentlerini üretebilirler. Derin tabaka kondrositleri koyu mor boyanırlar. Eklem lokalizasyonuna bağlı olarak tek hücre şeklinde veya chondrons denilen koloniler şeklinde bulunabilir. Chondrons yapıları kıkırdak matriksi içerisinde fonksiyonel subkompartmanlardır (22, 59).

3-Tidemark tabakası (tidemark zone): Tidemark 10 mikrometre (μm .) kalınlığında hücreden

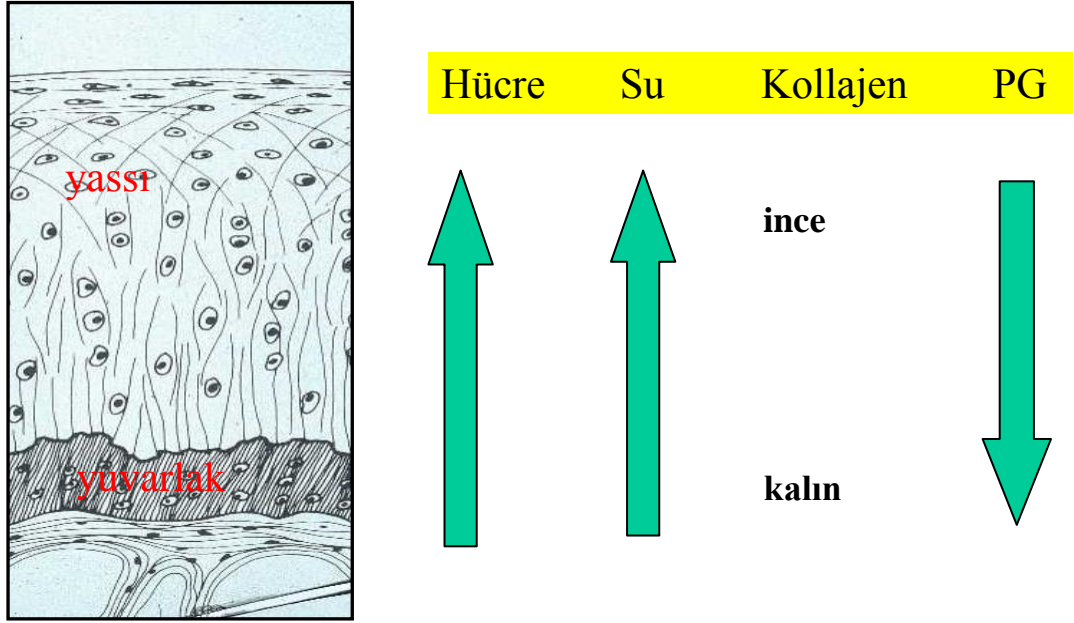
bağımsız bir çizgidir. Histolojik boyama ile görünür hale gelir. Kalsifiye ve kalsifiye olmamış kıkırdak arasında yer alır. Moleküler içeriği bilinmemektedir. Sadece kalsiyum içeren mineral depozitlerinin burada biriktiği bilinmektedir. Tidemark'ın metabolik artıkların toplandığı bir bölge olduğu söylenebilir. Bu çizgi yaş arttıkça yukarıya doğru yer değiştirir (22, 59).

4-Kalsifiye tabaka (calcified zone): Kondrositlerin en derindeki tabakasıdır ve alttaki kemikle bir sınır oluşturur. Kemikten farklı olarak daha seyrek kalsifikasyon içerir. Ayrıca subkondral kemik hemotoksilen-eosin ile pembe-kırmızı boyanırken, kalsifiye kıkırdak tabakası açık mor boyanır. Kemik yapıdaki besinlerin kıkırdağa diffüzyonunda bir bariyer gibi davranır (22, 59).



Resim 1: Normal eklem kıkırdağının histolojik görünümü (22, 59).

Eklem kıkırdağının hücreler ve matriks olmak üzere iki ana bileşeni vardır. Erişkin eklem kıkırdağının büyük bölümünü ekstrasellüler matriks oluşturur. Hücreler, yaşa bağımlı olarak dokunun %5 -10 veya daha azını oluştururlar. Kıkırdak katmanlarının hücre, su, kollajen ve PG içeriği katmanlara göre değişir (Resim 2).



Resim 2: Kıkırdak katmanlarının hücre, su, kollajen ve PG içeriğinin dağılımı (22, 59).

HÜCRELER (KONDROSİTLER)

Embriyonel hayatın altıncı haftasında mezenşimal hücreler perikondrium kanallarının genişlemiş alanlarında kıkırdak öncü hücreleri halinde görülmeye başlar. Bu öncü hücrelerden gelişen kondrositler mezenşimal hücre ailesindedir. Kondrositler, yuvarlak veya oval çekirdekli, çekirdeğe yakın hücre merkezinde bir çift sentriol ve iyi gelişmiş bir golgi aygıtı içeren hücrelerdir (59, 101).

Kondrosit membranı pek çok iyon kanalları içerir. Bunlardan potasyum kanalları ve kalsiyum kanalları elektrofizyolojik çalışmalarla tanımlanmıştır. Bu iyon kanalları sayesinde eklemdaki kondrositler, mekanik yüklenmelere iyon değişimi ile cevap verirler.

İntegrinler, kondrosit hücre yüzey proteinlerini oluşturan büyük bir ailedir. Hücre-hücre ve

hücre-matriks ilişkisini sağlar, " α ve β subunitlerinden oluşur. Eklem kondrositleri çoğunlukla " $\alpha3\beta1$ " ve " $\alpha V\beta3$ " kombinasyonlu integrinleri içerir. İntegrinler sinyal taşıma kapasitesi ve bağlanma seçiciliği gösterir. Dinlenmekte olan kondrositte integrin seviyesi çok düşüktür. Metabolik olarak aktif kondrositte ise integrin seviyeleri oldukça yüksektir ve yeni integrin subtipleri gelişir.

Kondrosit membranında ayrıca pek çok spesifik reseptörler yerleşmiştir. Bu reseptörler sayesinde çevredeki matrikse rağmen doku ve hormon sinyalleri kondrosit membranınca taranabilir. Hyaluronan reseptörleri, kondrosit matriksin hücre yüzeyine toplanmasında ve matriks metabolizmasında temel rolü oynar. Proteoglikanlar, hyaluronan reseptörleri ile kondrositlere bağlanırlar.

Kondrositler pek çok doku hormonu ve büyüme faktörlerine spesifik reseptörleri aracılığı ile cevap verebilirler. Bu faktörler arasında "asidic fibroblast growth factor (aFGF)", "basic fibroblast growth factor (bFGF)", "insulin like growth factor (IGF)", "Paratiroid hormon (PTH)", "transforming growth factor- β (TGF- β)" sayılabilir. Bu hormon reseptör ilişkisi kıkırdak gelişiminde ve erişkin kıkırdak metabolizmasının düzenlenmesinde önemlidir. Ayrıca bu ilişki makromoleküllerin sentezinde anabolik aktivite sağlamaktadır (22, 59) .

Kondrosit metabolizmasını etkileyen histamin, serotonin, interlökin-1 (IL-I), β -endorfin gibi katabolik mediyatörlerden IL-I'in reseptörü de iyi tanımlanmıştır. Son çalışmalarda IL-I reseptör konfigürasyonunda varyasyonlar saptanmıştır. Sözü edilen varyasyonların artrit patolojisinde önemli olduğu gösterilmiştir. Kondrositler normal metabolizmaları esnasında bir miktar prostoglandin E2 ve prostoglandin F2 α (PGE2-PGF2 α) da üretir. IL-I stimülasyonu ile PG sentezi 10 kat artar. Bu olay tamirin ve enflamasyonun stimülasyonunda yardımcı bir faktördür (22, 59).

Yetişkin bir organizmada aktif halde olmayan kondrositin çok düşük bir metabolizma hızı vardır. Erişkin hayat boyunca hücre proliferasyonu göstermez. İmmatür dönemde ve gelişim sürecinde, kırık iyileşmesi sürecinde, enzimatik olarak indirgenip doku kültürlerine konulduğunda, kondrosit metabolik olarak aktiftir. Aktif dönemde oldukça fazla miktarda ekstrasellüler matriks üretir. Ayrıca immatür kıkırdak, proteoglikan içeriği ve bağlayıcı protein içeriği bakımından zengindir. Sonuç olarak hem yetişkin bir organizmada, hem de hayatın daha erken evrelerinde kondrosit, enflamasyon ve travma gibi akut olaylara reaksiyon gösterebilir. Bu reaksiyonları da membrandaki spesifik reseptörlerle düzenler (59).

MATRİKS

Kıkırdak matriksi diğer bağ doku matrikslerinden farklıdır. Daha fazla doku sıvısı içerir. Ayrıca daha farklı tiplerde, daha farklı konsantrasyonlarda ve organizasyonlarda makromoleküller içerir. İçerdiği bu doku sıvısı kıkırdak ağırlığının %60-80'ini oluştururken yapısal makromoleküller kıkırdak ağırlığının %20-40'ını oluştururlar. Matriksi oluşturan kollajen lifler ve kondromukoproteinler kondrositler tarafından sentezlenir. Matriks makroskopik olarak homojen görünür. Bununla birlikte moleküler yapısı üç sınıf yapısal makromolekülden oluşur. Bunlar kollajenler, proteoglikanlar, nonkollajen proteinler (glikoproteinler)'dir (18, 22).

1. Kollajenler: On beş makromolekül protein içeren bir ailedir. Bu proteinler karakteristik helikal aminoasit zincirleri içerir. Kollajenler eklem kıkırdağının kuru ağırlığının %50'sini oluşturur. Eklem kıkırdak kollajeni oldukça dayanıklı, hayat boyu değişmeden kalan ve yarılanma süresi 50-300 gün olan bir yapıya sahiptir.

Kollajen, kıkırdağın şeklini korumada ve tensil kuvvetini sağlamada görev alır. Ayrıca diğer yapısal makromoleküller olan proteoglikanlar ve glikoproteinler kollajen yapının

üzerine tutunurlar. Böylece kollajen, eklem kıkırdağına kuvvet uygulandığında proteoglikan akışına karşı koyar (101).

Eklem kıkırdağı Tip II, VI, IX, X ve XI olmak üzere en az beş tip kollajen içerir . Tüm bu kollajen tipleri, nihai kollajen fibrillerini oluşturan temel ve en küçük moleküller olan, " α_1 , α_2 , α_3 " adı verilen protokollajenlerin farklı şekil ve sayılarda birleşmesiyle oluşur.

Eklem kıkırdak kollajenine esneklik veren ve onu deri, kemik ve fibröz doku kollajeninden ayıran yapı, üç adet α_1 protokollajen içeren Tip II kollajendir. Tip II kollajen eklem kıkırdak kollajeninin %90'ını oluşturur. Eklem kıkırdağını oluşturan kollajen fibrillerinin merkezinde Tip II ve Tip XI kollajenler bulunur. Bu merkez yapı etrafında tabakalar halinde Tip II kollajen molekülleri ve fibrilin yüzeyine yapışmış Tip IX kollajen bulunur. Fibrildeki kollajen tiplerinin çeşitliliği, kollajen fibrillerin büyüklüğünü ve şeklini belirler. Diğer minör kollajen tipleri bu majör fibril ağı arasında dağılmış halde bulunur.

Tip IX kollajenin bir kondroitin sülfat yan zinciri vardır. Bu molekül kollajen fibril ile proteoglikan arasında çapraz bir bağ oluşturur. Bu özelliği dolayısıyla makromolekülleri biraraya getirerek fonksiyonel bir kompleks oluşturabilir (Kollajen fibril-proteoglikan agregat kompleksi). Tip VI kollajen üç boyutlu bir ağ oluşturur; ancak fibril yapısında değildir. Kondronlar içerisinde bulunurlar. Tip VI kollajen, yüksek germe (tensil) stresi altındaki sinovyal doku, gözdeki trabeküler ağ gibi dokularda bulunur. Eklemdeki görevi de germe stresini dağıtmaktır. Tip X kollajen, primer olarak fetal büyüme plağı kıkırdağının hipertrofik tabakasında bulunur. Tip VI kollajen gibi Tip X kollajen de ağ şekillidir ve fibril yapısında değildir. Ayrıca Tip X kollajen, protokollajen içermez. Ancak diğer kollajen molekülleriyle çapraz bağlanma sonucunda protokollajen moleküllerini alır. Bu olayın fetal kıkırdak dokunun kalsifikasyonunda önemli olduğu sanılmaktadır.

Deri, kemik ve fibröz doku kollajeni, iki adet $\alpha 1$ ve bir adet $\alpha 2$ protokollajeni içeren Tip I kollajendir. Defektli eklem kıkırdağı kendi halinde iyileşmeye bırakılırsa yeni oluşan tamir dokusunda Tip I kollajen yoğunluğu artmış olarak gözlenir. Tip II kollajen ise düşük orandadır. Bu fibröz kıkırdak şeklinde iyileşen kıkırdak doku defektinin tipik özelliğidir (22, 25).

2. Proteoglikanlar: Polisakkarit zincirlerinden oluşan makromoleküllerin protein çekirdeklere kovalen bağ ile bağlanmasıyla oluşur. Bu moleküllerin temel yapısı karbonhidratlardır. Eklem kıkırdağı en az üç tip proteoglikan içerir (22, 59) (Resim 3);

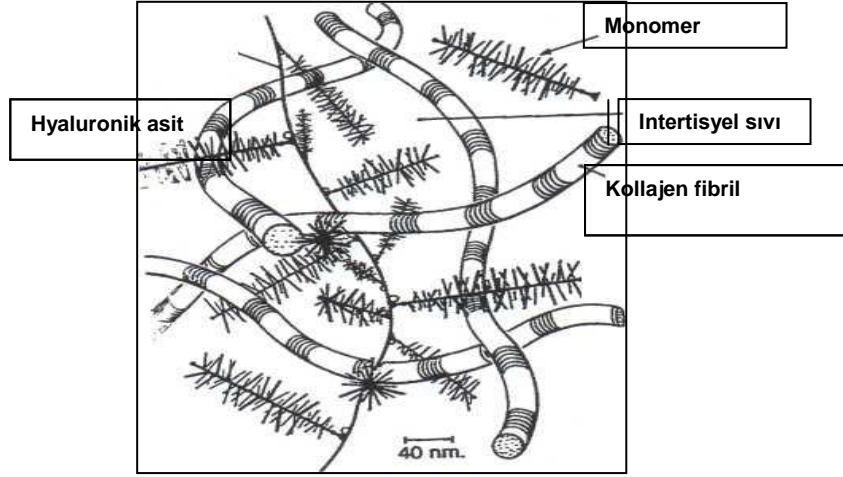
a. Agregan proteoglikan: Büyük miktarda kondroitin sülfat ve keratan sülfat içerir.

b. Nonagregan proteoglikan (biglikan): Amino-terminal uca yakın bir adet dermatan sülfat veya kondroitin sülfat zinciri içerir.

c. Nonagregan proteoglikan (dekorin): Amino-terminal uca yakın iki adet dermatan sülfat veya kondroitin sülfat zinciri içerir.

Agregan proteoglikanlar, kıkırdağın majör proteoglikanlarıdır. Matriksin interfibriler aralığının büyük bir kısmını doldururlar ve kompresyon kuvvetlerine karşı dokuya sertlik ve dayanıklılık verirler. Agregan; üç globüler (G) ve iki genişletilmiş (extended) olmak üzere beş adet bölgeden oluşur. N-terminal protein parçası G1 bölgesinden başlar ve metalloproteinazlar için çok sayıda saha içerir. Dekorin ve biglikan kollajene bağlanarak hücre fonksiyonunu etkiler. Her ikisi de agregan'a göre daha küçük miktarlarda glikozaminoglikan içerir. Dekorin ayrıcalıklı olarak yüzeyel tabakada bulunur.

Eklem kıkırdağının kollajen fibrille kuvvetlendirilen solid matriksinin moleküler organizasyonu Resim 3'te görülmektedir (62).



Resim 3: Eklem kıkırdağının kollajen fibrille kuvvetlendirilen solid matriksinin moleküler organizasyonu.

3. Nonkollajen proteinler (Glikoproteinler): Bu moleküller proteinle birlikte küçük miktarda oligosakkarit ve monosakkarit de içerirler. Bu moleküllerin bazıları matriksin makromoleküler yapısının organizasyonunda ve devamlılığında görev alır. Bu yüzden doku çimentosu olarak da adlandırılır. Geri kalan moleküller ise kondrositler ile diğer matriks molekülleri arasındaki ilişkide görev alır (22, 59). Kıkırdağın majör glukoproteini, "cartilage oligomericprotein (COMP)"dir. Ağ şeklinde bağlanan beş monomere oluşur. Kıkırdağın harici matriksin majör glukoproteini, fibronektindir. Normal kıkırdağta çok düşük miktarda olup, oranının artması patoloji göstergesidir. Kondrokalsin eklem kıkırdağında bol miktarda bulunan ve kalsiyum bağlayan bir glukoproteindir. Laminin kondrositlerin perisellüler matriksinde bulunur. Laminin kıkırdağın dışı dokularda bazal membranın majör komponentidir. Kıkırdağta bazal membran olmadığından görevi tam bilinmemektedir (59). Tüm bu makromoleküllerden; kartilaj spesifik Tip II kollajen, büyük agregan proteoglikan ve hyaluronan kıkırdağın matriksinin esas komponentleridir. Bu üç molekül birlikte doku kuru ağırlığının %90'ını oluştururlar. Bu üç majör elementle birlikte bulunan diğer kollajenler, küçük proteoglikanlar ve glikoproteinler ağırlık olarak olmasa da fonksiyonel olarak çok önemlidirler (22, 59) (Tablo I).

TABLO I: Eklem kıkırdağı matriksinin yapısal makromolekülleri (22, 59)

MOLEKÜL	YERİ	FONKSİYON
KOLLAJENLER		
TipII kollajen	Makrofibrilin ana komponenti	Germe (tensil) kuvveti sağlar
Tip VI kollajen	Perisellüler alandaki mikrofibrillerde	Germe kuvvetinin dağılımı
Tip IX kollajen	Makrofibril yüzeyine çapraz bağlanır	Fibril-interfibriler bağlantı
TipX kollajen	Perisellüler kafes yapısında bulunur.Sadece Hipertrofik kondrositlerce sentezlenir.	Tam bilinmiyor.Yapısal destek? Fötal Kıkırdak kalsifikasyonu
Tip XI kollajen	Makrofibrilin içinde ve üzerinde bulunur	Tip II kollajen ile fibril yapısının çekirdeğini oluşturur.
Tip XII- XIV kollajenge	Olasılıkla makrofibrilin yapısına katılırlar	Bilinmiyor.
PROTEOGLİKANLAR		
Agregan	Mayor proteoglikandır. G1 bölgesiyle hyaluronan bağlar en fazla derin tabakada bulunur.	Kompresif dayanıklılık sağlar
Decorin	Eklem yüzeyi ve perisellüler alanda bulunur	Makrofibril yapının düzenlenmesi
Biglican	Aggrecan'a benzer	Bilinmiyor
Fibromodulin	Dört keratan sülfat zinciri içerir	Decorin gibi
Lumican	İmmatürken keratan sülfat içerir	Decorin gibi
Syndecan	Hücre yüzeyinde bulunur.	
Perlecan	Heparan sülfat içerir.Hücre yüzeyinde bulunur	Hücre-matriks yapışmasında görevli
Süperfacial zone protein (SZP)	Eklem yüzeyi ve sinovyal sıvıda bulunur Yüzeyel tabaka hücrelerince sentezlenir.	Eklem kayganlığında görev alır
GLİKOPROTEİNLER		
COMP (Cartilage Oligomeric protein)	Trombospondin ailesinden beş kollu bir molekül	TipII kollajen bağlar ve karmaşık makrofibriler yapıda görev alır.
Kondrokalsin	Eklem kıkırdağında bolca bulunur	Kalsiyum bağlar
Laminin	Perisellüler alanda bulunur.	Bilinmiyor.
Kondroadherin	Lökin'den zengin bir proteindir	Hücre-matriks bağlanmasında görevli.
GLİKOZAMİNOGLİKANLAR		
Hyaluronan	Aggrecan'ın G1 bölgesine ve bağlayıcı proteine bağlanır. Kollajenjen fibril ile etkileşir.	Aggrecan'ın matrişte tutulması.
Keratan sülfat	Agregan ve fibromodulin yapısında bulunur.	
Heparan sülfat	Perlecan ve syndecan yapısında bulunur.	
Kondroitin sülfat	aggrecan ve Tip IX kollajenjen yapısında bulunur.	

MATRİKS METALLOPROTEİNAZLARI

Matriks metalloproteinazları kıkırdak matriksinin intrinsik komponentleridir. Stromelizin, jelatinaz, kollajenaz ve membran birleşik metalloproteinaz şeklinde sınıflandırılır. Kollajenazlar endoproteinazdır, üçlü heliks kollajen yapıdadır. Jelatinazlar indirgenebilir. Hem kollajenazlar hem de jelatinazlar kollajen harici diğer matriks proteinlerini de indirger. Stromelizinler pekçok substratı indirgeyebilir. Bunların arasında proteoglikanlar da bulunur. Proteoglikanlar indirgenince hyaluronan gibi molekülleri bağlayamaz (16, 18, 59).

Metalloproteinazlar matriks moleküllerinin normal döngüsünü bozar. Kollajen fibrillerin ve proteoglikan bileşiklerin makro yapılarını parçalar. Normal kıkırdakta ne kadar metalloproteinaz olduğu bilinmemektedir. Metalloproteinazların osteoartrit gelişmesinde ve ilerlemesinde rol aldığı düşünülmektedir (59).

Metalloproteinaz inhibitörleri "Tissue-induced metalloproteinase inhibitors (TIMP)" olarak bilinir. TIMP I, II ve III ile "cartilage-derived inhibitor (CDI)" olmak üzere dört izoformu bilinmektedir. CDI kıkırdakta üretilmez. Lenfatik sistemde sentezlenip kıkırdakta depolanır. Bu inhibitörler kollajen gibi matriks proteinlerine bağlanarak kıkırdak matriksinin metalloproteinazlar tarafından indirgenmesini büyük oranda önler (22, 59).

KIKIRDAK HASARI VE ONARIMI

Eklem kıkırdak hasarı restorasyonundaki zorluklar kondrositlerle ilgilidir. Kondrositler izole yapılarına rağmen çevreden gelen mekanik etkilere, sitokinlere, büyüme faktörlerine cevap verebilir. Kondrositlerin stimülatörlerindeki değişiklikler eklem kıkırdağı yıkımının ve dejenerasyonunun sebebi olabilir. Diğer bütün biyolojik sistemlerde olduğu gibi eklem kıkırdağının da doğal yapısını koruyabilmesi için belli bir dengesi vardır. Başlangıçta sentez sabit kalmasına karşın denge zamanla yıkım lehine döner ve bu andan itibaren hastanın semptomları başlar (13,14, 44, 56).

Aşırı mekanik stres veya enzimatik indirgenme matriks makromoleküler yapısını bozar. Ayrıca protein eksiklikleri, vitamin A, C, D eksiklikleri, yüksek enerjili radyasyona maruz kalmak da kıkırdak hücre dizilimini bozar. Çeşitli hormon tedavisi gören hastalarda da kıkırdak hasarına sıklıkla rastlanmaktadır (22, 44).

Başlangıçta Tip II kollajen konsantrasyonu değişmeden kalır. Ancak, kollajen ağı hasar görebilir ve agregan protein konsantrasyonu azalmasına paralel olarak proteoglikan agregasyonu azalabilir. Matrikste su konsantrasyonu artar. Matriksin sertliği azalır ve geçirgenliği artar. Matriksteki bu bozulmayı kondrosit algılar ve buna cevaben matriks sentezini, proliferasyonunu ve indirgenmesini artırır. Bu cevap dokuyu tamir edebilir ; doku statüsünü değiştirebilir, ya da kıkırdak hacmini artırabilir. Kondrositlerin aktivitesi yıllarca artmış olarak kalabilir. Yalnız katabolik aktivite anabolik aktiviteyi aşarsa veya eklem kıkırdağı tamamen kaybolup subkondral kemik açığa çıkarsa kondrosit cevabı belirgin olarak azalır (22, 44).

Herhangi bir nedenle harap olan kıkırdak alanında nekrotik ve atrofik değişiklikler olur. Defekt perikondrium veya çevre fasyalardan ilerleyen bağ dokusu ile doldurulur. Bu bağ doku granülasyon dokusu şeklindedir. Yetişkinlerde tamir bu gevşek granülasyon dokusunun kıkırdak dokuya dönüşmesi ile tamamlanır. Bu dönüşümlerde başlıca uyaranlar dış mekanik etkenlerdir (22) Tamir dokusundaki pek çok hücrenin sinovyumdan kaynaklandığı düşünülmektedir. Eğer subkondral kemik tabakaya penetrasyon varsa kemik iliğinden de hücreler gelebilir (58). Periosteal greftler ve otolog kıkırdak hücreleri kullanıldığında tamir dokusundaki hücrelerin sadece %7-8' inin transplante edilen dokudan geldiği görülmüştür (45, 58).

Oluşan bu tamir dokusu normal hyalin kıkırdaktan mekanik ve kimyasal olarak farklıdır. Pek çok araştırmacı kemik iliği hücrelerini tamir olayında kullanabilmek için defekti subkondral kemiğe kadar derinleştirirler. Böylece defekt birkaç ayda fibrokartilajinöz doku ile dolar. Genel olarak tüm deneysel metotlarda oluşan tamir dokusu normal dokuya göre daha

yumuşaktır. Yük karşısında daha kırılğan bir dokudur ve morfolojisiyle kimyasal bileşimi farklıdır. Ortalama bir yıl sonra tamir sahasına komşu kıkırdakta progresif dejenerasyon saptanır. Bu dejenerasyon tamir dokusuna da yayılır. Yenileyen bu dejenerasyon operasyon tekniğinden, defektin kenar stresinden veya bozulmuş eklem mekaniğinden kaynaklanabilmektedir (45, 58, 102). Eklem kıkırdak hasarının tamirinde amaç, eklem kıkırdağının tam restorasyonu, ağırların ortadan kaldırılması, azalan veya kaybolan eklem hareketinin ve eklem fonksiyonunun yeniden kazanılması olmalıdır.

Eklem kıkırdağının kendini yenileme kapasitesi ve çözüm yolları

Bilim adamları uzun zamandır sinovyal eklemlerde eklem kıkırdağının kaybından veya dejenerasyonundan sonra onarım veya rejenerasyonunu sağlama yollarını aramaktadırlar. Burada onarım ve rejenerasyon kavramları arasındaki farkı ortaya koymak gerekmektedir. Onarım, yaralanan eklem kıkırdağının hyalin kıkırdağa benzeyen ancak yapı, fonksiyon ve kompozisyon olarak farklı olan yeni bir doku ile restorasyonudur. Rejenerasyon ise, normal eklem kıkırdağından ayırt edilemeyen yeni doku oluşumunu ifade eder (19, 21, 23).

Eklem kıkırdağının travma veya osteoartrit sonrasında kendini yenileme sorunu iyi bilinmektedir. Tedavi edilmemiş kıkırdak kayıplarındaki onarım dokusu tipik olarak fibröz kıkırdaktır. Yakın zamana kadar, yaralanmış kıkırdak yüzeyini onaracak ve olası dejeneratif artrit önleyecek etkili bir tedavinin olmadığı bilinmektedir. Ancak otolog kondrosit transplantasyonu ile başlayan kıkırdak doku mühendisliği ümit vericidir (36).

Lezyonun derinliğine ve büyüklüğüne bağlı olarak iki tip kıkırdak onarım mekanizması vardır. Hastanın kanıyla veya kemik iliğiyle bağlantısı olmayan izole kıkırdak lezyonları kollajen ve proteoglikan gibi metabolik ürünlerin üretimi ile onarılmaya çalışılır. Buna "intrinsik onarım" denir. Bu iyileşme tipi yetersizdir ve önemli bir onarım dokusu oluşturmaz.

Kıkırdak ve altındaki kemiğe ulaşan lezyonlarda ise, kemik iliği ve kan onarım işlemine katılır. Buna ise "ekstrinsik onarım" denir. Mezenkimal hücrelerle oluşan bu onarım sonucunda metaplastik değişim ile fibröz kıkırdak oluşur (36). Son otuz yılda klinik ve deneysel çalışmalarla ön plana çıkan yapay matriksler, büyüme faktörleri, perikondrium, periosteum ve transplante edilen kondrositlerle osteokondral ve kondral kayıplarda kıkırdak yapımını stimüle edilmeye başlanmıştır (20, 24, 29, 38, 47, 48, 55, 57, 61, 65, 71, 74).

Siklik yüklenme ve hareket kıkırdak tamirini uyarır. Ayrıca, halen klinik olarak uygulanan osteotomiler, subkondral kemiğe penetrasyon (mikrokırık oluşturma) ve eklem distraksiyonu gibi birçok ameliyatla kıkırdak kayıpları onarılmaya çalışılmaktadır. Ancak bu yöntemlerin birbirlerine karşı kesin üstünlükleri kanıtlanmış değildir (21).

Artroskopideki ve görüntüleme tekniklerindeki ilerlemelerle ortopedik cerrahların kondral kayıpların sıklığını ve tiplerini ayırt edebilme şansları artmıştır. Lezyonların doğru tanınabilmesi değerlendirmeyi ve tedavi planını da kolaylaştırmıştır. Tüm bu ilerlemelere karşın halen uygulanan tekniklerle hyalin kıkırdakla aynı mekanik ve biyokimyasal özelliklere sahip dokunun elde edilmesi mümkün değildir. Yapılan tedaviler sonucunda elde edilen fibröz kıkırdak osteoartrit gelişme sürecini tümüyle engelleyememektedir (9, 10).

Eklem kıkırdağının yaşa bağlı ilerleyici olmayan değişikliklerini (yüzeyel fibrilasyon, fokal lezyonlar gibi) osteoartrit sendromunun bir parçası olarak kabul etmemek gerekir. Bu tip lezyonlar genelde semptom oluşturmaz ve eklem fonksiyonlarını fazla etkilemezler. Eklem kıkırdağının izole ve osteokondral kayıpları genelde travma sonucu oluşur. Eklem yüzeyinin büyük bölümü de sağlamdır. Bu lezyonlar genelde aktif olan adolosanlarda veya genç erişkinlerde görülür. Eklem ağrısı, effüzyon ve mekanik disfonksiyon gibi semptomlara neden olur. İzole kondral ve osteokondral lezyonların prognozunun tam olarak bilinmemesine karşın, klinik deneyimler bu lezyonların, tedavi edilmezse kendiliğinden iyileşemeyecek ve dejeneratif

artrit gelişmesine neden olacağını göstermiştir. Bu nedenle kayıpların tedavisi osteoartrit gelişimini önler veya geciktirir. Tek başına debridmanın sonuçları çok değişken olduğu için, araştırmacılar farklı tedavi metodları üzerinde durmaktadırlar (58).

Subkondral kemiğe penetrasyon, mikrokirik, osteokondral multipl otogreft transferi, osteotomi, eklem distraksiyonu, yumuşak doku greftleri, kondrosit transplantasyonu, büyüme faktörleri ve yapay matriks kullanımı gibi değişik tedavi yöntemleri yeni eklem yüzeyi oluşumunu uyarmak için kullanılmaktadır (8-10, 12, 17, 19-21). Bu yöntemlerin tümü ile ilgili birçok klinik çalışma olmakla birlikte, sonuçlarının karşılaştırılması çok güçtür. Bunun nedeni, yöntemlerin uygulandığı hastaların deney hayvanlarının yaş grupları, doku kayıplarının tipleri, geri kalan sağlam dokuda osteoartrit varlığı aynı değildir. Aynı zamanda, bu klinik ve deneysel çalışmaların bir çoğu ileriye dönük veya kontrollü de yapılmamıştır (9, 10, 12, 19).

Subkondral kemiğe penetrasyon (Foraj):

Yeni eklem yüzeyi oluşumunun uyarılması için yapılan ve sık kullanılan orijinal bir yöntemdir. Tam kat kayıplarda veya ileri derecede kıkırdak dejenerasyonu olan bölgelerde subkondral bölgeye uzanan delikler açılması kanamaya ve kıkırdak yüzeyde fibrin pıhtı oluşumuna neden olur. Yüzey aşırı yükten korunursa, ayrılaşmamış mezenkimal hücreler pıhtıya göç eder ve burada proliferer olur. Bazen, bu hücreler kondrosite ayrılaşır ve fibrokartilajinöz bir yüzey oluştururlar. Genelde bu doku eklem kıkırdağı ile aynı özelliklere sahip değildir ve uzun dönem takip sonuçları başarılı bulunmamıştır. Ortopedik cerrahlar, zamanla yöntemi geliştirerek, artroskopik olarak eklemi yıkayıp, kıkırdakta abrazyon uygulayıp, subkondral kemiğe penetrasyon yapmışlardır.

Sonuçlardaki farklılıkların, sonunda oluşan tamir dokusunun kalitesi ve miktarındaki kişisel değişikliklerden oluştuğu düşünülmektedir. Oluşan dokunun kalitesi ve miktarı ile

semptomatik ve fonksiyonel değişimi karşılaştırılan bir çalışma yoktur. Yapılan bir deneysel çalışmada, tavşanların dizlerinde subkondral abrazyon ile penetrasyon karşılaştırmıştır (19-21). Subkondral penetrasyonun abrazyona gore daha sağlıklı bir tamir dokusu oluşturduğu düşünlmektedir.

Mikrokirik oluşturma:

Bu yontemle abrazyon ve penetrasyona gore daha az doku hasarı oluşturulduğu düşünlmektedir. Subkondral kemiğe doğru mekanik alet yardımıyla delikler oluşturulur. Onarımın uyarılması amaçlanır. Bu teknikle diğer yontemlerle oluşturulan termal etkiler ortaya çıkmaz. Ancak, yine de bu yontemle diğerlerini karşılaştırılan ileriye donk, kontrollü bir çalışma yapılmadığından fibröz kıkırdağın oluşumu ve semptomların gerileme düzeyi ile ilgili somut bir bilgi yoktur (4, 21).

Osteokondral multipl otogreft transferi (Mozaikplasti):

Femur eklem yüzündeki lokal osteokondral veya kondral kayıpların tedavisinde, yk taşımayan eklem yüzünden alınan osteokondral greftlerin hasarlı bölgeye transferidir. Aktarılan dokunun orijinal eklem kıkırdağı olması nedeniyle mit verici bir girişim olduğu bildirilmiştir . Bu greftin kemik bölümü iyileşmektedir. Silindirik greftler arasındaki boşlukların kıkırdağ doku ile her zaman dolmaması, yerleştirilen greftlerde seviye farkı gibi birtakım sorunları olduğu vurgulanmaktadır. Uzun dönem takip sonuçlarıyla ilgili bir bilgi yoktur (4, 21).

Osteokondral allogreftler:

Lokal osteokondral kayıplarda son yıllarda kullanılan bir yontemdir. Uzun dönem klinik

takiplerinde, izole osteokondral kaybı olan seçilmiş hastalarda girişim ağrıyla azaltmakta ve greftler bütünlüğünü korumaktadır. Bu yöntemle tedavi edilen hastaların bir kısmında 20 yıl sonra bile dejeneratif artrit veya herhangi bir komplikasyon gelişmediği görülmüştür. Bunlara karşın, kondral ve osseöz dokunun iyileşme mekanizması, allogreftin immunojenitesi ve uzun dönem takiplerdeki biyomekanik özellikler gibi sorular halen cevapsızdır (20, 21).

Osteotomiler:

Klinik deneyimler, cerrahların kalça ve diz eklemlerindeki lokalize kırıkta dejenerasyonlarının veya kayıplarının tedavisinde osteotomileri benimsemelerini sağlamıştır. Eklem yüzeylerinin temas konfigürasyonlarını değiştirerek dejenere veya defektif kırıkta binen stresi azaltır. Böylece, azalmış yüklenmeyle birlikte eklem yüzlerindeki kayma hareketi fibröz kırıkta oluşumunu uyarır. Ayrıca, patolojik bölgeye binen yükün azalması ve intraosseöz basıncın azalması gibi mekanizmalarla ağrı da azalır. Bazı cerrahlar eklem debridmanı ve subkondral penetrasyonu bu yöntemle kombine etmişler, ancak bu yöntem çok sık kullanılmamaktadır.

Hastanın yaşı, obezite, ileri derecede eklem dejenerasyonu, instabilite, eklem hareket genişliği, fazla düzeltme gibi parametreler sonuçları etkilemektedir. Klinik çalışmalar seçilmiş hastalarda sonuçların iyi olduğunu bildirmekle birlikte, geç dönemde semptomlar yeniden başlamaktadır. Bu yöntem kalça ve diz eklemleri dışında nadiren kullanılır (19, 21).

Eklem distraksiyonu:

Bu yöntem, özellikle ayak bileği posttravmatik dejeneratif artritinde artrodeze alternatif olarak önerilmektedir. Van Valburg ve arkadaşları (99) 11 hastalık serilerinde, İlizarov tipi eksternal fiksator uygulayarak, eklemi ilk beş gün günde 0,5 mm distrikte etmişlerdir. Ameliyattan

birkaç gün sonra yürümeye izin vererek, 6-12 hafta sonra hareket başlamışlardır. Eksternal fiksator yirmi hafta sonra çıkarılmıştır. Hiçbir hastada ankiloz gelişmemiş, hastaların tümünün ağrısı azalmış, beş hastada ağrısız hareket, altı hastada da hareketlerde artma saptanmıştır (19, 20).

Periosteal ve perikondral greftler:

Klinik ve deneysel çalışmalar, eklem kıkırdağı kayıplarına Periosteal ve perikondral greftler yerleştirildiğinde yeni kıkırdak yapımını uyardığını göstermiştir (65). Genelde araştırmacılar bu teknik konusunda olumlu sonuçlar bildirmektedir. Ayrışmamış hücrelerin veya kondrositlerin yaş ilerledikçe eklem yüzü oluşturma yeteneklerinin azaldığını göstermektedir. Yaşla ilgili bu çıkarım yukarıda anlatılan diğer teknikler için de geçerlidir. Diğer faktörler eşit olduğu zaman genç hastalar kıkırdak yüzeyi tamir etme veya oluşturma konusunda daha avantajlıdır (19, 21, 65).

Yapay matriksler:

Detektif bölgeye konan yapay matriks, konak hücrelerin nüfuz etmelerine matriks oluşturmalarına ve yeni oluşan hücrelerin yapışmasına izin verir, bazen de hücreleri uyarır. Karbon lif, bu amaçla kullanılan yapay matrikslerdendir. Kıkırdak doku tamiri için bir iskelet oluşturduğu ve onarımı uyardığı gösterilmiştir. Kıkırdak kayıplarının büyüme faktörü ve hücre transplantasyonu ile tedavisinde bu oluşumların defekt içinde stabilizasyonuna ve salınımına ihtiyaç vardır. Bu yaklaşımların başarısı büyük oranda yapay matrikse bağlıdır. Araştırmacılar bu amaçla birçok biyolojik veya biyolojik olmayan, eriyebilir veya eriyemeyen malzeme üzerinde çalışmaktadırlar.

Kollajen, fibrin, hiyaluronan, karbon lif, hidroksiapatit, poröz polilaktat, poliglikolat, politetrafloroetilen, polyester ve aljinatlar gibi yapay matriksler kıkırdak

onarımında kullanılmıştır. Matrikslerin hangisinin daha üstün olduğunu ortaya koyacak verilere ihtiyaç vardır. Özellikle, sinovit oluşturma ile ilgili veriler çok azdır. Kollajen jel, fibröz glikolik asit ve fibrinin hayvan deneylerinde, hücre yapışması ve uyumu ile ilgili sonuçları ümit vericidir. Fibrin büyüme faktörlerinin kontrollü salınımı için uygundur (19, 21, 31, 33, 36, 39, 51, 66, 80, 89, 90, 94, 104, 105).

Kıkırdak doku mühendisliği

Kondral ve osteokondral kayıplarda, konak dokunun kendini yenileme kapasitesinin sınırlı olması, araştırmacıları hücreleri defektif bölgeye transplante etme yollarını aramaya itmiştir. Kıkırdak doku mühendisliği bu sorunu çözmek için ortaya çıkmış biyoteknolojik bir alandır. İlk kez 1977 yılında Green tarafından tanımlanmıştır (38). 1990'lı yıllarda Brittberg ve arkadaşları (11, 12) tarafından klinik uygulama sonuçları bildirilmiştir. Elde edilen yapay kıkırdak normal eklem kıkırdağıyla aynı biyomekanik özelliklere sahip olmalıdır. Ancak bu şekilde eklem yüksek streslere maruz kaldığı in vivo ortamda normal fonksiyonunu sürdürebilir (12, 21, 36, 38, 86, 96).

Kıkırdak doku mühendisliği ile tedavi edilebilecek klinik sorunlar şunlardır:

- 1- Osteokondritis dissekans
- 2- Osteokondral kırıklar
- 3- Kondral kırıklar
- 4- Osteonekroz
- 5- Dejeneratif eklem hastalığı (osteoartrit)

Bu beş klinik sorun patogenezi ve prognozu açısından birbirinden farklıdır. Bu nedenle yapay kıkırdak ile tedavi sonuçları da birbirinden farklı olacaktır. Örneğin, genç bir hastadaki osteokondral kırık, osteonekrozu olan yaşlı bir hastadan daha farklı klinik, biyolojik ve mekanik

sonuçlar oluşturur.

Kıkırdak doku mühendisliğinde, değişik konular üzerinde araştırmalar yürütülmektedir. Bu araştırmalar, transplante edilecek hücrenin kökeni, hücrenin hangi  boyutlu matrikse ekileceği, doku kültürü teknikleri ve süresi, yapay kıkırdağın tespit sorunları üzerinde yoğunlaşmaktadır (37, 55, 95).

Büyüme faktörleri

Molekül ağırlıkları 4000-60000 dalton arasında değişen, çok az miktarları bile hücrenel aktivitelemi etkileyebilen proteinlerdir. Farklı faktörlerin görevleri ve etkileri ile ilgili yeni buluşlar sürmektedir. Hcrenel fonksiyonları endokrin, parakrin, otokrin veya intakrin mekanizmalarla sağlar (14, 53, 54, 60, 63, 75, 88).

Büyüme faktörlerinin herhangi bir hücreyi etkileyebilmesi, o hücrenin, o faktör için reseptöre sahip olup olmamasına bağlıdır. Reseptöre bağlanma sonucu hücre içinde zgn bir cevaba neden olan bir seri sinyal ortaya çıkar. Etki, çoğunlukla tirozin kinaz uyarılarak sağlanır. Her hücrenin farklı büyüme faktörleri için farklı sayıda reseptörü bulunur. Büyüme faktörlerinin o bölgedeki konsantrasyonu ve reseptöre bağlanan miktarı, elde edilecek sonucu belirler. Matriks de, büyüme faktörlerinin çözünebilirliğini değiştirerek, hücrenel aktivitelemi düzenleyecek faktör konsantrasyonunun değişmesini sağlayabilir. Ayrıca matriks, büyüme faktörlerinin bağlanıp çözülmesini ayarlayarak, ortamdaki faktörler için rezervuar görevi görür. Yine matriks, herhangi bir hücrenin, herhangi bir büyüme faktörüne vereceği yanıtı belirleyebilir (14, 53, 54, 60, 63, 75, 88).

İskelet sistemiyle ilgili primer düzenleyici büyüme faktörleri; IGF, FGF, TGF-β, PDGF ve rhBMP'dir (tablo II). IGF, ilk kez Daughaday ve Salmon (28, 78) tarafından tanımlanmıştır. Bu araştırmacılar hipofizektomi yapılan ratlarda büyüme hormonu (GH)'nun

invitro olarak kıkırdakta sülfat emilimini stimüle ettiğini bulmuşlardır. GH tedavisi verilen hayvanlarda "sulphation factor" denilen bir madde tanımlanmıştır (28). Bu buluş dolaşımında GH etkisini yöneten bir faktör olduğu yönündeki araştırmalara hız vermiş ve somatomedin bulunmuştur. Birkaç yıl sonra da IGF-I tanımlanmıştır. En son olarak da rat karaciğer hücrelerinde bulunan ve IGF-II'ye benzeyen bir otokrin faktör olan "MSA (multiplication stimulating activity)" tanımlanmıştır (78).

Büyüme faktörleri, proliferasyon, migrasyon, matriks sentezleme ve ayrışma gibi birçok hücrel aktiviteyi etkilemektedirler. FGF, IGF ve TGF-β'nın kondrosit metabolizmasını ve kondrogenezisi etkilediği gösterilmiştir. Kemik matriksi bu moleküllerle birlikte, BMP ve PDGF'yi de içerir. Bu nedenle, kemiğin açığa çıkmasına neden olan osteokondral yaralanmalar veya subkondral penetrasyon, mikrokırık, osteotomi gibi girişimler, kıkırdak onarımında önemli rol oynarlar.

Kondral ve osteokondral kayıpların büyüme faktörleriyle lokal tedavisi sadece subkondral kemiğe penetrasyon uygulamasından daha üstündür. Yapılan bir deneysel çalışmada, kobay dizinde kısmi kalınlıkta kondral kayıp oluşturulmuş ve buraya TGF-β kontrollü salınımı yapan fibrin matriks yerleştirilmiştir. TGF-β'nın kıkırdak tamirini uyardığı gösterilmiştir. Kondral defekti dolduran hücreler buraya sinovyal dokudan göçüp, fibröz matriks oluşturmuşlardır. Hücrelerin büyüme faktörlerine yanıtı yaş ilerledikçe azalmaktadır (14, 53, 54, 60, 63, 75, 88).

Genç yaştaki kişilerdeki kondral veya osteokondral kayıpların büyüme faktörleriyle tedavisi umut vericidir. Ancak bu tedavi yaklaşımı ileri araştırmalarla desteklenmelidir. Çünkü, büyüme faktörleri sadece eklem içindeki kıkırdağı değil, tüm dokuları etkilemektedir.

TABLO II: İskelet sistemiyle ilgili başlıca büyüme faktörleri (46, 50)

BÜYÜME FAKTÖRÜ	TEMEL ETKİSİ
IGF-I (Somatomedin-C)	Mitojenik, anabolik, Growth Hormon'un bazı etkilerini düzenler.
IGF-II*	Mitojenik, anabolik, genel olarak IGF-I den daha az etkili
FGF-1** (asidik fibroblast growth faktör)	Mitojenik, anjiojenik, hücre ayrışmasında etkili
FGF-2 ** (bazik fibroblast growth faktör)	Mitojenik, anjiojenik, hücre ayrışmasında etkili
TGF-β ++	Multifonksiyonel
BMP++	Kemik formasyonu indükleyici
PDGF***	Mitojenik

*IGF-I ve IGF-II. Yapısal ve biyolojik olarak insülinle ilgilidir.

** FGF-1 ve FGF-2 . En az dokuz üyesi bulunan FGF ailesinin prototipleridir.

++ TGF-β ve BMP. Çok büyük bir ailenin önde gelen üyeleridir. Bu aile, en az 5 çeşit TGF-β, en az on beş çeşit BMP ile birlikte aktivinler, inhibitörler ve diğer morfogenezis faktörlerini içerir.

*** PDGF . A ve B olarak isimlendirilen iki subünitinin AA: AB: BB şeklinde değişik bağlanmalarıyla üç alt form içerir.

İskelet sisteminde büyümeyi düzenleyen GH- IGF-I aksıdır (46, 92) . Hipotalamus'tan GHRH (growth hormone releasing hormone) salınır, bu da ön hipofizden GH sekresyonuna neden olur. GH sistemik dolaşıma girerek karaciğer ve büyüme plağı gibi hedef dokulara gider. GH'un spesifik hücre yüzey reseptörüne bağlanması ile hücreler IGF-I üretmeye başlar. IGF-I dolaşıma katılarak hedef hücrelere gidebilir (endokrin etki), aynı hücrenin yüzey reseptörüne bağlanıp etki edebilir (otokrin etki), veya etraftaki hücreler üzerinden etki edebilir (parakrin etki). IGF-I negatif feedback etki ile kendi sentezini regüle eder.

Rat karaciğerlerinde yapılan çalışmalara dayanılarak IGF-I'in serumdaki düzeyinin karaciğerdeki depolardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak IGF-I başka dokularda da sentezlenebilir. Bu dokularda IGF-I m-RNA seviyesi GH tarafından arttırılır. Bu da IGF-I'in hem endokrin, hem parakrin, hem de otokrin etkiye sahip olduğunu göstermektedir (46, 50, 92).

IGF'lerin; GH etkilerini yönetmek, insülin benzeri metabolik aktivite ve otokrin etkiyle büyüme stimülasyonu olmak üzere üç ana görevi vardır. GH sekresyonu ve IGF-I serum düzeyleri yaşla birlikte azalır. Bunun muhtemel nedeni azalmış fizik aktivitedir. Beslenme IGF-I konsantrasyonu regülasyonunda önemli bir faktördür. Hem akut, hem uzun süreli açlıklar serum IGF-I düzeyini azaltır (46, 73).

Epidermal growth factor (EGF); urogastron ile idantik olup 53 amino asitlik bir polipeptittir. Birçok dokuda bulunur ve trombosit degranülasyonu sırasında salınır. Hücrelerin çoğunda EGF'e ait reseptörler bulunur. En çok sayıda reseptör epitel hücrelerde bulunur; ancak endotel hücreler, fibroblast ve düz kas hücrelerinde de reseptörler vardır. Epitel hücreler, endotel ve fibroblastlar için kemotaktik özelliği vardır. Anjiogenezi ve kollajenaz aktivitesini uyarıcı özelliğe sahiptir.

Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF); mezenkimal hücreler için mitojen olarak ilk kez bulunan bu faktörün anjiogenezi uyardığı ve yara iyileşmesinde rolü olduğu gösterilmiştir.

Hem asidik hem de bazik olmak üzere iki tip FGF tanımlanmıştır. Bazik FGF'ün damarlanmayı uyarıcı özelliği yaklaşık 10 kat fazladır. Endotelial hücreler FGF'yi hem sentezler hem de ona yanıt verirler. Her iki tip FGF de endotel proliferasyonu ve motiliteyi arttırarak neovaskülarizasyonu hızlandırır. Heparinin etkilerini güçlendirir. Bazik FGF, ayrıca kollajen sentezini de uyarır; yara kontraksiyonunu, epitelizasyonu, fibronektin ve proteoglikan sentezini uyarır.

PDGF; lokal olarak üretilen ve lokal olarak etki gösteren bir growth faktördür. Trombositlerin alfa granülleri içinde bulunur. 32000 dalton ağırlığında bir glikoprotein olan PDGF, 2 disülfid bağıyla bağlanmış bölümden oluşur. A ve B adını alan bu üniteler %56 oranında benzerlik gösterirler. Homodimer (PDGF-AA, PDGF- BB), heterodimer (PDGF- AB) şekillerinde ifade edilen faktörün her üç formunun biyolojik aktiviteleri temelde benzer olup B ünitesi mitogenezi biraz daha güçlü uyarabilir. Tümörler, endotel hücreler, makrofajlar, düz kas hücreleri ve trombositler PDGF benzeri büyüme faktörleri salgırlar. Trombositlerin içinde depolanırlar (14, 53, 54, 60, 63, 75, 88).

PDGF yara iyileşmesinde önemli rol oynar. Trombositlerde ve yara iyileşmesinin erken evresinde oluşan sıvının içerisinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur. PDGF fibroblastları, osteoblastları ve kondrositleri içeren mezenkimal orijinli hücreler için potent bir mitojenik ve kemotaktik faktördür ve böylece doku rejenerasyonunu ve onarımını artırma yeteneğinde olduğuna inanılmaktadır. PDGF reseptörleri kondrositleri içeren bir takım hücre tipleri üzerinde tanımlanmıştır ve reseptörlerin sayısı IL-1 gibi inflamatuvar sitokinlerin varlığıyla düzenlenmektedir (14, 53, 54, 60, 63, 75, 88).

PDGF; makrofajlar ve polimorf nüveli lökositlerin kemotaksisini uyarır. Fibroblast ve düz kas hücrelerinde hem kemotaksis hem mitogenezi uyarır. PDGF, kollajen, hyalüran ve fibronektin sentezini uyarır; ayrıca kollajenaz aktivitesini arttırır (14, 53, 54, 60, 63, 75,

88).

PDGF'nün bir alandaki konsantrasyonu, hangi hücrelerin ona daha çok yanıt verme yeteneğinde olduğunu gösterir, çünkü farklı hücreler, farklı PDGF konsantrasyonları ile o ortama çekilirler.

PDGF, hayvan modellerinde, etkili bir yara iyileşmesi destekleyicisi olarak gösterilmiştir. Tavşan kulağı modelinde epitelizasyon hızını arttırdığı saptanmıştır . Farelere yerleştirilen subkütan sponçlara hergün PDGF beta enjekte edilmiş ve enjeksiyon yapılmayanlara oranla, yapılanlarda tedavinin 7. gününde hücre miktarında ve kollajen içeriğinde artma saptanmıştır. Farelerdeki insizyonel yaralanmalara kollajen vezikül içinde PDGF-BB uygulandığında, 7 hafta sonunda, kontrollere oranla, yara iyileşmesi daha belirgin olarak saptanmıştır. Radyasyon uygulanmış kobaylardaki insizyonel yaralar, kollajen vezikül içinde PDGF-BB ile desteklendiğinde, 7 ve 12. günlerde, yaranın sağlamlığında belirgin artma olduğu gösterilmiştir. Diabetik farelerde eksizyonel yaralar, PDGF'ün topikal uygulanımı ile desteklendiğinde daha hızlı kapanmıştır (14, 53, 54, 60, 63, 75, 88).

PDGF ve yara iyileşmesinde aktif olan diğer büyüme faktörlerinin rolüne ait indirekt kanıtlar, mikrofraktürle tedavi edilen kırıkta defektlerine verilen iyileşme cevabında görülebilir. Bu prosüdür kondral lezyonun içinde ve etrafında artroskopik delici ile subkondral kemik içinde mikroperferasyonlar oluşturmayı içerir. Kemiğin mekanik bütünlüğü deliklerin dikkatli bir şekilde açılmasıyla sağlanır. Artroskopik delici subkondral kemiğe geçtiğinden emin olmak ve kanamayı gözleyebilmek için 2-4 mm lik derinliğe kadar ilerletilir. PDGF gibi büyüme faktörleri defekt bölgesine salınırlar, bunlar kırıkta etrafındaki hücreler üzerinde kemotaktik ve mitojenik etkiler gösterirler ve mezinkal kök hücrelerini infiltre ederler. Bu, yeni doku formasyonu için otolog hücrelerle oluşturulan yapı iskelesinin yerleştirilmesi ile

genişletilebilen zenginleştirilmiş bir çevre sağlar (14, 53, 54, 60, 63, 75, 88).

PDGF 'ün kıkırdak onarımı üzerine etkileri aşağıdaki şekilde özetlenebilir :

- Kondrosit proliferasyonu artırır
- Kondrosit kültürlerinde proteoglikan sentezini artırarak düzenler,
- Dinlenme zonundaki kondrositlerin matürasyonunu inhibe eder.

Somatomedinler (insülin benzeri büyüme faktörleri); esas olarak hepatosit ve fibroblastlarca sentezlenir ve fibroblast proliferasyonunu uyardığında PDGF ile birlikte çalışır. PDGF ve FGF gibi maddeler, hücrelerin, hücre siklusuna erken girmelerini sağlayan (G0 ve G1) kompetans faktörü olarak davranırlar. İnsülin, EGF ve somatomedinler de progresyon faktörü olarak davranır ve hücre siklusunun diğer basamaklarının ilerlemesini sağlar (S1, G2, M) (14, 53, 54, 60, 63, 75, 88).

TGF- β ; trombositler, makrofajlar, lenfositler, kemik, böbrek gibi farklı dokulardan izole edilmiştir. Trombositlerin alfa granülleri içinde yoğun miktarda bulunur, hasarlanan bölgeye degranülasyonla salınır. Makrofajlar tarafından kendi üretimini otokrin yolla düzenler. Ayrıca monositleri uyararak FGF, PDGF, TNF- α , IL-1 gibi büyüme faktörlerinin salınımını sağlar. Hemen hemen tüm hücrelerin TGF- β için reseptörü vardır ve en azından teorik olarak TGF- β ile uyarılabilirler (14, 53, 54, 60, 63, 75, 88).

TGF- β , makrofajlar için kemotaktiktir; fibroblast kemotaksisi ve proliferasyonunu uyarır. TGF- β , kollajen sentezinin en güçlü uyarıcısı olarak bilinir. Ayrıca kollajenazı aktive eden diğer faktörlerin uyarıcı etkisini azaltır. TGF- β fibroblastlarca fibronektin ve proteoglikan sentezini; keratinositlerce de fibronektin sentezini uyarır. Yara kontraksiyonun da rol oynar. Matriksi organize edebilme özelliği nedeni ile remodeling olayında görev yapar.

TGF- β tek başına, endotel hücre proliferasyonunu inhibe ederken, başka bir kofaktörle birlikte anjiogenezi stimüle eder. Ayrıca epitelial hücre proliferasyonunu uyarır (14, 53, 54, 60, 63, 75, 88).

TGF- α ; hem EGF hem de vaccinia büyüme faktörüne (VGF) benzer. EGF ile %30 yapısal benzerlik gösterir; EGF'nin daha otokrin çalışabilen bir varyantı olarak kabul edilebilir. Uyarılmış makrofajlar, trombositler ve keratinositler ve vücuttaki diğer bazı hücrelerce sentezlenir. Biyolojik etkilerini EGF reseptörlerine bağlanarak gösterir. Mezenşimal, epitelial, endotelial hücre büyümesini ve endotel hücre kemotaksisini uyarır. Endotelial hücre proliferasyonunu sağlaması açısından EGF ile aynı güçte; ancak anjiogenezi stimüle etmesi açısından 10 kat daha güçlüdür. Agar plaklarında fibroblast uyarımı sağlarken, TGF- β 'nin mutlaka olması gereken bir kofaktörüdür (14, 53, 54, 60, 63, 75, 88).

IL-I; ilk olarak endojen bir pirojen ve lenfosit proliferasyon uyarıcısı olarak tanımlanmıştır. Makrofajlar tarafından olduğu gibi, bazı başka hücrelerce de, bakteriyel ürünler, C5a, immün kompleksler, gama interferon ve prostaglandinlerin uyarımı ile salgılanır. Epitel hücreleri, polimorf nüveli lökositler, monosit ve lenfositler için kemotaktik; fibroblastlar için değildir. IL-1, fibroblast proliferasyonunu, araşidonik asit metabolizmasını, kollajen sentezini, kollajenaz ve hyalüronidaz aktivitesini uyarır. Vasküler endotel hücrelerinin proliferasyonunu inhibe eder. İnterlökin-2 (IL-2); ise esas görevi T hücre büyüme faktörü olarak davranmaksa da, yara iyileşmesinde rol oynayabilir (14, 53, 54, 60, 63, 75, 88).

Tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α); adını ilk olarak, in vitro tümör hücreleri için sitostatik veya sitosidal bulunduğu için almıştır. Kanser kaşeksisi, endotoksik şokta da rol

oynadığı düşünülmektedir. Sonraları, tümör hücrelerinin olduğu kadar, normal hücrelerin de TNF reseptörlerine sahip olduğu gösterilmiştir. Kaşeksiye neden olan kaşektin ile idantik olduğu ve ateş yükseltici özelliği olduğu gösterilmiştir (14, 53, 54, 60, 63, 75, 88).

TNF- α ; TNF- β ile uyarılmış makrofajlar tarafından sentezlenen, 157 amino asitli bir polipeptittir. Fibroblastlar için mitojenik özellik taşır; kollajen ve kollajenaz biyosentezi ve PgE2 salınımını uyarır. In vitro, endotel proliferasyonunu inhibe etmesine rağmen anjiogenezi uyarıcı etkisini, ikinci bir mesajcı yoluyla yaptığı sanılmaktadır. Bir seri hücresel fonksiyonu düzenleyen değişik faktörlerin salınmasını uyarır (14, 53, 54, 60, 63, 75, 88).

KIKIRDAK DEFEKTLERİNDE DİĞER TEDAVİ YÖNTEMLERİ

Eklem kıkırdak hasarı sonrası defekti periost, perikondrium, demineralize kemik matriksi, aljinat süngerlerle veya otolog hücre ve sentetik maddelerle doldurup iyileşmeyi stimüle etmek konusunda pek çok deneysel ve klinik çalışma mevcuttur. İyileşme kalitesini arttırmak için devamlı pasif hareket (CPM), defektin tedavi öncesi "kondroitinaz ABC" ile muamelesi, ek büyüme faktörlerinin kullanılması gibi yöntemler denenmiştir. Subkondral kemik tabakasına penetrasyon ve kombine periost ve perikondrium transplantasyonu, defekte rejenerasyonu artırır. Böylece yüksek hücre yoğunluğu olan bir doku oluşur. Ancak, yapısal, kimyasal ve mekanik özellikleri normal dokudan farklıdır. Otolog veya allojenik kıkırdak hücreleriyle, büyüme faktörleriyle, polilaktik asit matriksle ve periosteal hücrelerle yüklenmiş dacron veya teflon gibi maddelerin, karbon fiber petlerin kullanımı denenmiştir (1, 10, 58, 64, 69).

Periosteal ve perikondral greftler, travmatik, debride edilmiş, rezeke edilmiş eklem kıkırdağının yerine yumuşak doku interpozisyonel greftlerinin yerleştirilmesi esasına dayanır. Alınacak sonuçta yaş, eklem hareketi, tamir dokusunun korunma şekli önemlidir. Periosteal ve

perikondral greftlerin undiferensiye hücre kaynağı oldukları düşünülmektedir. Ortamın iyi hazırlanması ve büyüme faktörleriyle desteklenmesi durumunda hyalin benzeri kırıkta ile tamir sağlanabilir. Ancak interpozisyon greftleri zaman içinde enkondral ossifikasyon gösterirler. Bu da tamir dokusunda kırılmalara ve uzun dönemde kötü sonuçlara neden olur. Tip V kollajenin varlığı enkondral ossifikasyonun habercisidir. Hareket, normal yük verme ve genç yaş enkondral ossifikasyonun minimal olması yönünde pozitif etkenlerdir (1, 44, 45, 69, 77).

Otolog kondrosit implantasyonu büyük ilgi gören bir başka yöntemdir. Kondrosit kültürleri hastadan alındıktan 3-4 hafta sonra reimplante edilir. İmplantasyonda osteokondral defektler debride edilir ve periosteal flep normal kırıkta sınırına dikilir. Kondrosit kültürü periosteal flep altına yerleştirilir. Flebin hücre katmanı eklem tarafında olmalıdır. Böylece yeni matriks için GH ve hücre kaynağı hizmeti verebilir. Bu yöntemle hyalin benzeri kırıkta geliştirilmiştir. Osteokondral otogreftler ve allogreftler, kırıkta defektine subkondral kemiğin ve hyalin kırıktağın full-thickness olarak yerleştirilmesi esasına dayanır. Burada kök hücrelerinin enkondral ossifikasyonu veya fibrokartilaj oluşturma gibi problemler yoktur ama iki santimetreden daha büyük çaplı defektlerde kullanımı oldukça zordur. Osteokondral defektlere tek veya multipl plaklar yerleştirilebilir. Multipl plaklar yerleştirilirse, yöntem "mozaikplasti" adını alır. Burada problem donör ve alıcı hyalin kırıkta arası boşluğun fibrokartilajla dolmasıdır. Son zamanlarda, posttravmatik osteokondral defektlerde allogreft uygulamaları ile ilgili çalışmalar vardır (2, 4, 5).

MATERYAL VE METOD

Bu çalışma Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Patoloji Anabilim Dalı olanakları kullanılarak yapıldı. Çalışmamızda ortalama ağırlığı 2500 gr (1600-3000 gr) olan 24 adet matür (18 haftalık) Yeni Zelanda tipi Albino tavşan kullanıldı. Tavşanlar standart laboratuvar diyeti ve su ile beslendi.

Tavşanlar; her grupta 8 adet olacak şekilde üç gruba ayrılarak birinci gruba tam kat osteokondral defekt oluşturulan grup (A), ikinci gruba tam kat osteokondral defekt oluşturulup defektin kollajenle doldurulduğu gruba (B), üçüncü gruba tam kat osteokondral defekt oluşturulup defektin kollajen süngerle doldurulduğu ve lokal PDGF uygulanan gruba (C) harfleri verildi. Bu grupların hepsi toplam 12 hafta takip edildi. Çalışma için bütün tavşanların sağ diz medial femoral kondilleri kullanıldı.

CERRAHİ TEKNİK

Tüm tavşanlar operasyondan 12 saat önce aç ve susuz bırakıldılar. Ameliyattan bir saat önce tüm tavşanlara profilaktik olarak 75 mg/ kg sefazolin sodyum (Sefazol[®]-Mustafa Nevzat İlaç sanayi) intramusküler (i.m) yolla verildi . Ameliyatlarda anestezi yöntemi olarak tavşanlarda enjeksiyon anestezisi uygulandı. Bu amaçla sedasyon için Xylazine hidroklorid 10 mg/kg (Rompun %2 Bayer), anestezi amacıyla Ketamin hidroklorür (Ketalar[®]-Parke &Davis) 50 mg/kg dozunda i.m olarak uygulandı. Daha sonra operasyon için tavşanların sağ dizini traş edildi. Bütün tavşanlar operasyon masasına almayı takiben, sağ diz bölgesi povidone–iodine (Betadine[®]) solüsyonu ile boyandı. Ameliyat sahası açıkta kalacak şekilde steril örtülerle örtüldü. Sağ diz bölgesinde 3 cm .lik medial parapatellar insizyonla cilt, cilt altı faysa geçildikten sonra, medial artrotomi ile patella laterale disloke edilerek diz eklemine ulaşıldı (Resim:4). Medial femoral kondilin yük taşıyan bölgesinde, 2.7 mm.lik matkap ucu (Synthes[®]) ve el perforatörü (Aesculap[®]) kullanılarak, Messner ve Gillquist'in (58) tarif ettiği yöntemle 3.5 mm çapında, 4

mm derinliğinde tam kat osteokondral defekt oluşturuldu (Resim:5). Defektte meydana gelen kanama ve oluşan mikro debrisler serum fizyolojik ile yıkanarak uzaklaştırıldı. A grubundaki 8 tavşanda oluşturulan defekt boş bırakıldı. Daha sonra patella redükte edildi. Eklem kapsülü 4/0 keskin iğneli vicryl ile suture edildi. Cilt 3/0 keskin iğneli ipek ile usulüne uygun kapatıldı. Ameliyat bölgesi tekrar Betadine® ile silindi. B grubundaki 8 tavşanda oluşturulan defekt Tip I kollajen (Ativene®, Davol Inc, Cranston, USA) sünger ile dolduruldu (Resim :6). Daha sonra patella redükte edildi. Eklem kapsülü 4/0 keskin iğneli vicryl ile suture edildi. Cilt 3/0 keskin iğneli ipek ile usulüne uygun kapatıldı. Ameliyat bölgesi tekrar Betadine® ile silindi. C grubundaki 8 tavşanda oluşturulan defekt Ativene® kollajen sünger ile dolduruldu. Daha sonra kollajen sünger üzerine 62.5 ngr hPDGF (human platelet derived growth factor) (Sigma® Catalog no:P-8147, St. Louis, USA) (Resim:7) enjekte edilerek emdirildi. Daha sonra patella redükte edildi. Eklem kapsülü 4/0 keskin iğneli vicryl ile suture edildi. Cilt 3/0 keskin iğneli ipek ile usulüne uygun kapatıldı. Ameliyat bölgesi tekrar Betadine® ile silindi. Tavşanlar anestezi etkisinden kurtulup uyanana dek diğer tavşanlardan izole edildi. Daha sonra normal günlük aktivitelerini yapacak şekilde önceki kafeslerine alındı. Tavşanlara herhangi bir hareket kısıtlaması uygulanmadı. Ameliyat sonrası ilk üç günde, günde iki doz olacak şekilde 75 mg/kg sefazolin sodyum (Sefazol®) profilaksi amaçlı i.m. olarak yapıldı. Cerrahi sonrası ilk 10 günlük dönemde, A grubundan bir, ve C grubundan bir tavşan, gastroenterit ve enfeksiyon nedeniyle kaybedildi. Tüm gruplara ait hayvanlar 12. haftanın sonunda % 7.5'lük potasyum klorür (KCl-Biosel) enjekte edilerek sakrifiye edildi. Sakrifikasyon sonrası sağ dize aynı insizyonla girilerek femoral kondiller açığa çıkarıldı. Daha sonra gigli testere yardımıyla diz eklemi suprakondiler bölgeden osteotomize edildi ve oluşturulan defektlerin fotoğrafı çekilip, makroskopik skorlaması yapıldı. Daha sonra histopatolojik inceleme yapılmak üzere %10'luk tamponlanmış formalin solüsyonuna alındı.



Resim:4: Cerrahi teknik diz ekleminin makroskopik görüntüsü



Resim:5: Cerrahi teknik diz ekleminin makroskopik görüntüsü –defekt oluşturulması



Resim:6: Kollajen tip-I (Ativene)



Resim:7: PDGF (Sigma)

HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

%10'luk nötral formalin solüsyonundaki femur kondillerinin histopatolojik değerlendirilmesi Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD'da aynı patolog tarafından yapıldı. Dokular formalin solüsyonundan, dekalsifiye edilmek üzere formik asit- formalin zayıf asit solüsyonuna alındı. Bu solüsyon 5-10 cm³ % 90'lık formik asit + 5 cm³ formalin distile su ile 100 cm³'e tamamlanarak hazırlandı. Dekalsifikasyon 48 saatte tamamlandı. Dekalsifiye olan dokulardan parafinize edilmek üzere, 22 no bisturi ile defektli alanı da içeren örnekleme yapıldı. Parafinize bloklar -4 °C'de 20 dakika bekletildikten sonra, dört mikrometre inceliğinde kesit alınarak hemotoksilen-eosin (HE) ile boyandı (6, 81, 82).

Kıkırdak matriks boyaması

Kıkırdak matriks her üç grupta da Toluidin blue (TB) ile boyandı. Çevre sağlam kıkırdak dokuyla kıyaslandı.

Tip II kollajen antikor ile yapılan immunohistokimyasal inceleme

Immunohistokimyasal boyama için Collogen Type II, Ab-2 (Neomarkers[®], St. Louis, USA) boyası kullanıldı. Hazırlanan kesitler polilizinli lamlara alındı, ksilenle deparafinize edildi, azalan derecelerde etil alkolden geçirildi, PPS (fosfat bazlı salinle) ile yıkanarak ve "Biotinylated link" 10 dakika; "Streptavidin-HRP" 10 dakika ve "AEC substrate-Chromogen solution" 10 dakika uygulandı, mikrodalga fırında inkübe edildi. Daha sonra distile su ile yıkandıktan sonra AEG substrate kromojen solüsyonu uygulandı ve 37° etüvde 15 dakika inkübe edildikten sonra kapama mediası ile kapatılarak boyama sonuçları değerlendirildi.

Histolojik değerlendirme, HE ile boyanan kesitlerde "Sellers'in modifiye histolojik değerlendirme skalası" kullanılarak yapıldı (Bu skala onarım esnasındaki değişiklikleri incelemek için dizayn edilmiştir.) (Tablo IV). Bu skala kullanılarak tamir sırasındaki

değişiklikler incelendi. Değerlendirme için defekt ortasından alınan bir kesit kullanıldı. Değerlendirme skalasındaki skor, "0" (normal kıkırdak) ile "31" (tamir olmamış kıkırdak) puan arasında olacak şekilde, sekiz kategoride düzenlendi.

1. kategoride; defekt sınırındaki marjinal kıkırdak ile defekti dolduran kıkırdağın karşılaştırılması yapıldı. Normal komşu kıkırdak dokuya oranla defektin dolması yüzde olarak değerlendirildi. Buna göre defektin %100 dolması, yeni dokunun tüm defekti doldurduğunu ve normal eklem yüzeyine doğru yayıldığını gösterir.

2. kategoride; tamir dokusunun onu çevreleyen kıkırdakla uyumu ve bütünleşmesi incelendi.

3. kategoride; matriks boyanması yapıldı. Yeni oluşan matriksin orijinal matrikse nazaran boyanma ve boya tutma özellikleri incelendi.

4. kategoride; hücrel morfoloji değerlendirildi. Buna göre yeni kıkırdak oluşumu, yüzeyel tabakada sütunlar halinde organize olan kondrositlere bakılarak ölçüldü. Bu sütunların genişliği total tamir dokusu genişliğine bölünerek ölçüm yapıldı.

5. kategoride; sınırlar dahil edilmeden defektin yapısına bakıldı. Bu yapı, tamir dokusu içindeki yüzeyle bağlantısız boşlukların sayısı ve genişliğine göre değerlendirildi. Eğer geniş çatlaklar varsa ve bunlar eklem yüzeyi kollapsı ile birlikteyse not edildi.

6. kategoride; yeni oluşan kıkırdağın yüzey yapısı incelendi. Fibrilasyon olup olmaması ve düzensizlik puanlamayı belirledi.

7. kategoride; subkondral kemiğin tamiri incelendi. Subkondral kemiğin orijinal Tidemark Çizgisi'ne kadar olan rejenerasyonuna bakıldı. Yeni oluşan subkondral kemiğin orijinal Tidemark Çizgisi'nin altında veya üstünde olması belirleyici faktör oldu.

8. kategoride; yeni Tidemark oluşumuna bakıldı. Defektin toplam genişliği oluşan yeni Tidemark'a bölünerek ölçüm yapıldı.

Tablo III: Modifiye Histolojik Değerlendirme skalası (81, 82)

KATEGORİ 1:Normal komşu kırıkda yüzeye oranla defektin dolması	PUAN
%91-110	0
%111-125	1
%76-90	1
%51-75	2
%26-50	3
<%25	4
KATEGORİ 2:Tamir dokusunun onu çevreleyen kırıkda ile uyumu:	PUAN
Normal devamlılık ve uyum	0
Azalmış hüresellik	1
Devamlılıkta bir yüzde eksiklik	2
Devamlılıkta her iki yüzde de eksiklik	3
KATEGORİ 3 : Matriks boyanması	PUAN
Normal	0
Önemsiz azalma	1
Orta derecede azalma	2
Önemli azalma	3
Boyanma yok	4
KATEGORİ 4 : Hüresel morfoloji	PUAN
Normal	0
Kondrosit morfolojisi taşıyan yuvarlak hücreler çoğunluktaysa:	
Sütunlar şeklinde radial zone'un %75 ten fazlası	0
Sütunlar şeklinde radial zone'un %25-%75' i	1
Sütunlar şeklinde radial zone'un %25 ten azı (dezorganize)	2
Kondrosit morfolojisi taşıyan yuvarlak hücreler %50 ise:	
Sütunlar şeklinde radial zone'un %75 ten fazlası	2
Sütunlar şeklinde radial zone'un %25-%75' i	3
Sütunlar şeklinde radial zone un %25 ten azı (dezorganize)	4
Fibroblast benzeri işi hücreler çoğunluktaysa:	5
KATEGORİ 5: Tüm defektin yapısı (sınırlar dahil olmadan)	PUAN
Normal	0
1-3 küçük boşluk	1
1-3 büyük boşluk	2
3 ten fazla büyük boşluk	3
Yarılma ya da fibrilasyon	4
KATEGORİ 6: Yüzeyin yapısı	PUAN
Normal	0
Önemsiz fibrilasyon ya da düzensizlik	1
Orta derece fibrilasyon ya da düzensizlik	2
Siddetli fibrilasyon ya da düzensizlik	3
KATEGORİ 7 :Yeni subkondral kemiğin yüzde olarak değeri :	PUAN
Yeni kemik orijinal Tidemark in altındaysa:	
% 90-100	0
%75-89	1
%50-74	2
%25-49	3
< %25	4
Yeni kemik orijinal Tidemark 'ın üstündeyse:	
% 90-100	0
%75-89	1
%50-74	2
%25-49	3
< %25	4
KATEGORİ 8: Tidemark oluşumu	PUAN
Tam oluşum	0
%75-99	1
%50-74	2
%25-49	3
<%25	4

BULGULAR

MAKROSKOBİK BULGULAR

Dokular histolojik inceleme için fikse edilmeden önce her defekt gros olarak incelendi ve defektin son hali fotoğraflandı. Tamir dokusunun bitişiğindeki normal kıkırdaktan farkı değerlendirildi. Spontan iyileşmeye bırakılan (A) grubu, kollajen sünger ile doldurulan (B) grubu ve kollajen sünger ile doldurulup lokal PDGF uygulanan (C) grubu kendi aralarında karşılaştırıldığında 12. hafta sonunda benzer makroskopik özellikler gösterdiler.

Onikinci haftada hem B hem de C grubundaki tamir kıkırdağının rengi ve yapısı bitişiğindeki normal kıkırdağa çok benziyordu (Resim 8, 9). Defektler hemen hemen tümüyle hyalin kıkırdak alanları ile doluydu ve düzenli doku ile iyi bir devamlılık vardı. Kontrol grubunda ise defektin rengi beyaz ile mor arasındaydı ve çoğu defektte yüzey düzensizliği devam ediyordu. C grubundaki defektteki onarım dokusunun yüzeyi A ve B grubundaki defektte göre daha düz ve düzenliydi .12 haftanın sonunda makroskopik olarak defekt bulutumsu beyazdı ve sınırları belirsizdi (Resim:10).

Tüm bu bulgular ışığında, makroskopik iyileşmede her üç grubun kıkırdağının aynı özellikleri gösterdiği saptandı. Lokal uygulanan PDGF'nin matür kıkırdağın defekt alanındaki makroskopik iyileşmesine pozitif katkısı görüldü.

İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz SPSS 11 programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki farkı araştırmak için Mann-Whitney-U testi ve grup içi histopatolojik farklılıkları incelemek için Kruskal-Wallis testi kullanıldı. $p < 0,05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.



Resim 8: Kontrol grubunun makroskobik görüntüsü (Defektin boş bırakıldığı grup), A grubu



Resim 9: Kollegen sünger ile defektin doldurulduğu B grubunun makroskobik görüntüsü



Resim 10: Kollajen sünger ve lokal PDGF uygulanan C grubunun makroskobik görüntüsü

MİKROSKOBİK BULGULAR

Histolojik değerlendirme, HE ile boyanan kesitlerde Sellers'in modifiye ettiği histolojik değerlendirme skalası kullanılarak yapıldı (Tablo IV). Bu skala kullanılarak tamir sırasındaki değişiklikler incelendi. Değerlendirme için defekt ortasından alınan bir kesit kullanıldı (Resim 11, 12, 13, 14).

1. Her üç grup arasında 4. ve 5. kategori hariç diğer 6 kategoride istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edildi (Tablo V).
2. A grubunda; defekt yapısı, defektin dolması, onarım dokusunun çevre kıkırdak ile uyumu ve yeni subkondral kemik gelişimi bütün hayvanlarda yüksek sonuç elde edildi.
- 3- B grubunda 5. kategori (Tüm defektin yapısı (sınırlar dahil olmadan)) hariç diğer tüm kategorilerde A grubuna oranla histolojik parametrelerde belirgin düzelme olduğu dikkati çekti.

4- C grubunda ise tüm kategorilerde hem B hem A grubundan daha olumlu sonuçlar elde edildi. Fakat hücrel morfoloji (kategori 4) ve tüm defekt yapısı (kategori 5) kategorilerinde hem gruplar arasında hem de aynı grup içerisindeki değişik hayvanlar arasında birbirinden farklılıklar göstermekteydi.

5- A grubu ve B grubu kendi aralarında istatistiksel olarak parametreler kıyaslandığında 1, 7, ve 8. kategorilerde anlamlı sonuç bulunurken; 2, 3, 4, 5 ve 6. kategorilerde her iki grup arasında anlamlı istatistiksel veriler elde edilemedi ($p < 0.05$).

6- A ve C grubu istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; 4. ve 5. kategori haricinde diğer tüm kategorilerde anlamlı istatistiksel farklılıklar bulunmuştur.

7- B ve C grubu kendi aralarında kıyaslandığında; 1. (Normal komşu kıkırdak yüzeye oranla defektin dolması) ve 4. kategoriler hariç diğer tüm kategorilerde anlamlı istatistiksel farklılık elde edildi.

Grup	Defektin dolması	Çevre kırıkta uyum	Matriks boyanması	Hücre morfoloji	Tüm defektin yapısı	Yüzeyin yapısı	Subkondral kemik onarımı	Tidemark oluşumu	P	Total skor	Ortalama skor
A (n=7) Ort.±SS	2,33 ± 0,82	2,83 ± 0,40	3,00 ± 0,00	3,33±,37	2,83±1,17	2,50±0,55	3,50±0,55	2,66± 0,52	0,187	23.00±2.37	2,87±0,81
B (n=8) Ort.±SS	1,00±0,00 ^a	2,62±0,52	2,75±0,46	3,62±1,06	2,87±0,83	2,50±0,53	2,00±0,53 ^a	2,00±0,00 ^a	0,001	19.37±2.13	2,42±0,92 ^a
C (n=7) Ort.±SS	1,00±0,00 ^b	1,00±0,00 ^{bc}	1,50±0,55 ^{bc}	2,50±0,55	1,67±0,82 ^c	1,00±0,00 ^{bc}	1,17±0,40 ^{bc}	1,17±0,40 ^{bc}	0,001	11.00±1.67	1,37±0,64 ^{bc}
P	0,001	0,001	0,001	0,151	0,070	0,001	0,001	0,001	0,001	17.95±5.30	0,001

A grubu: Tam kat osteokondral defekt oluşturulup tedavi edilmeyen kontrol grubu.

B grubu: Tam kat osteokondral defekt oluşturulup kollajen süngerle doldurulan grup.

C grubu: Tam kat osteokondral defekt oluşturulup rekombinant PDGF emdirilmiş kollajen süngerle doldurulan grup.

^a; A ile B arasında anlamlı düzeyde fark var (p<0,05).

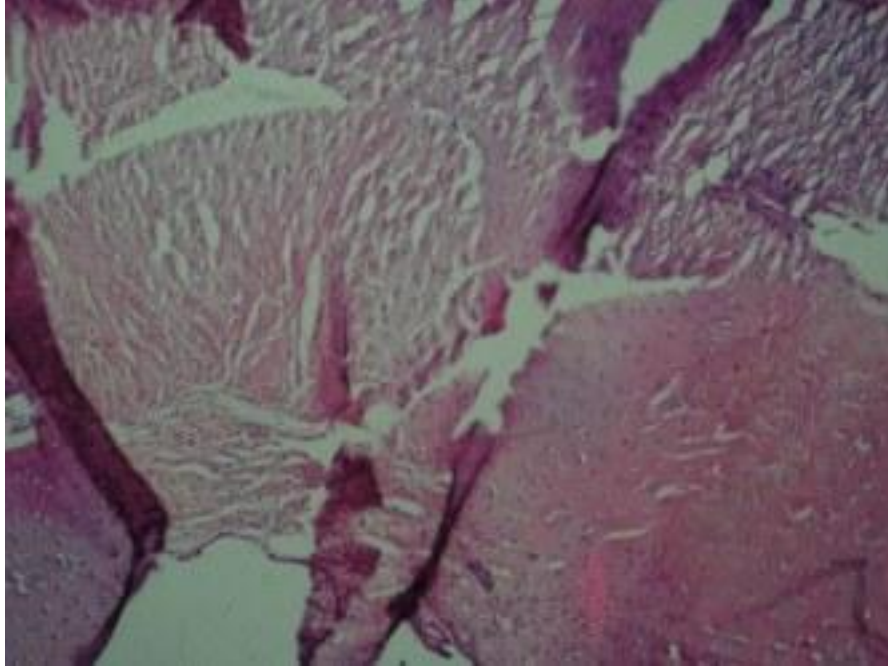
^b; A ile C arasında anlamlı düzeyde fark var (p<0,05).

^c; B ile C arasında anlamlı düzeyde fark var (p<0,05).

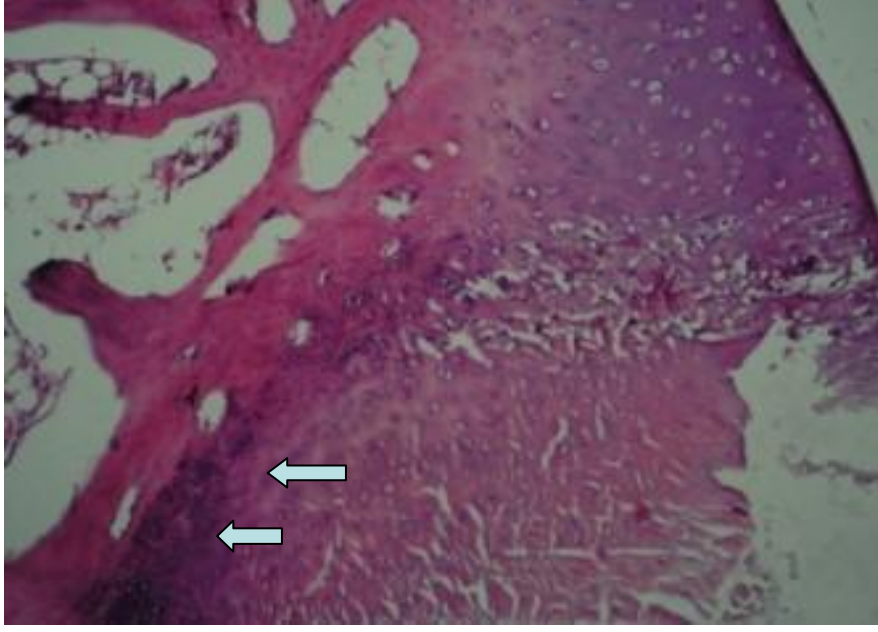
Tablo IV: Çalışmadaki üç grubun istatistiksel olarak karşılaştırılması

8- A grubunda Toluidin blue (TB) ile boyandığında kıkırdak matrikste boyanma (çevre sağlam kıkırdakla kıyaslandığında) saptanmazken B grubunda matriks boyanması orta derecede azalmış ve C grubunda ise hafif azalmış olarak izlendi (Resim 15, 16, 17).

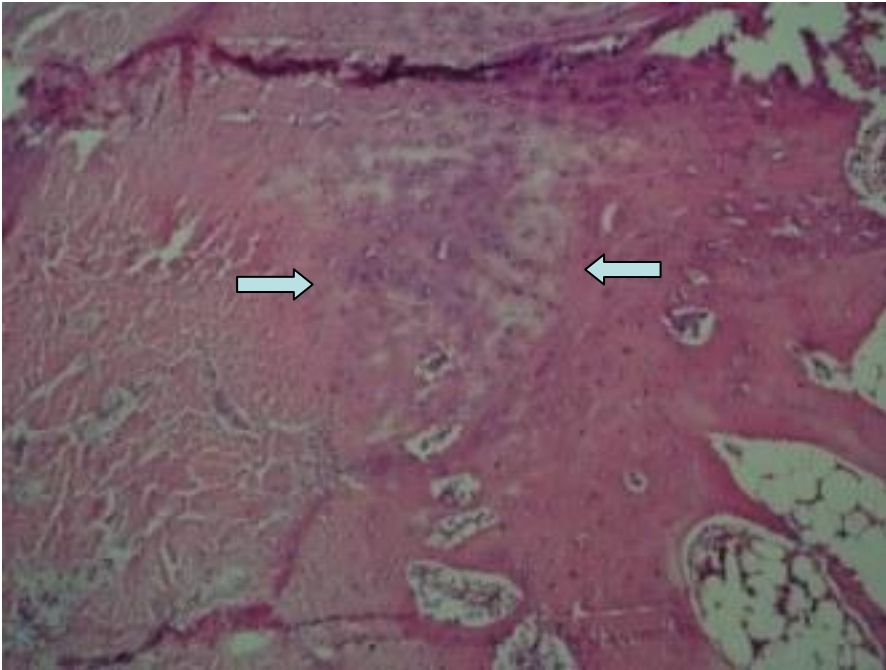
9- Tip-II kollajen boyama sonuçlar ; A grubunda hiç boyanma saptanmadı, B grubunda hafif-orta derecede ve C grubunda ise orta-kuvvetli derecede pozitif intrasitoplazmik boyanma saptandı (Resim 18, 19, 20).



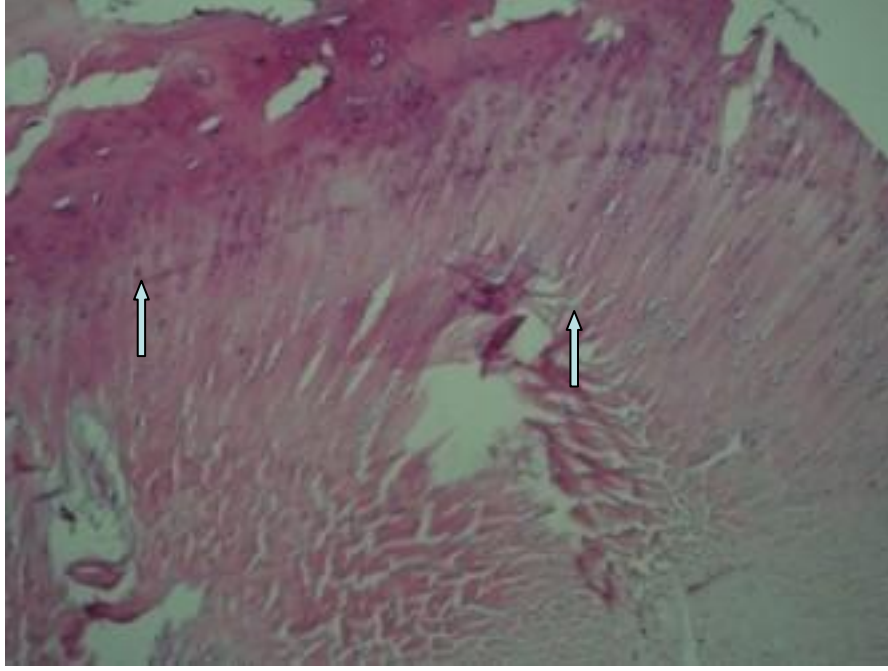
Resim 11: 40X (HE) A grubunda eklem defektini dolduran çoğu yuvarlak kondrosit morfolojisinde fibrokartilijenaz doku.



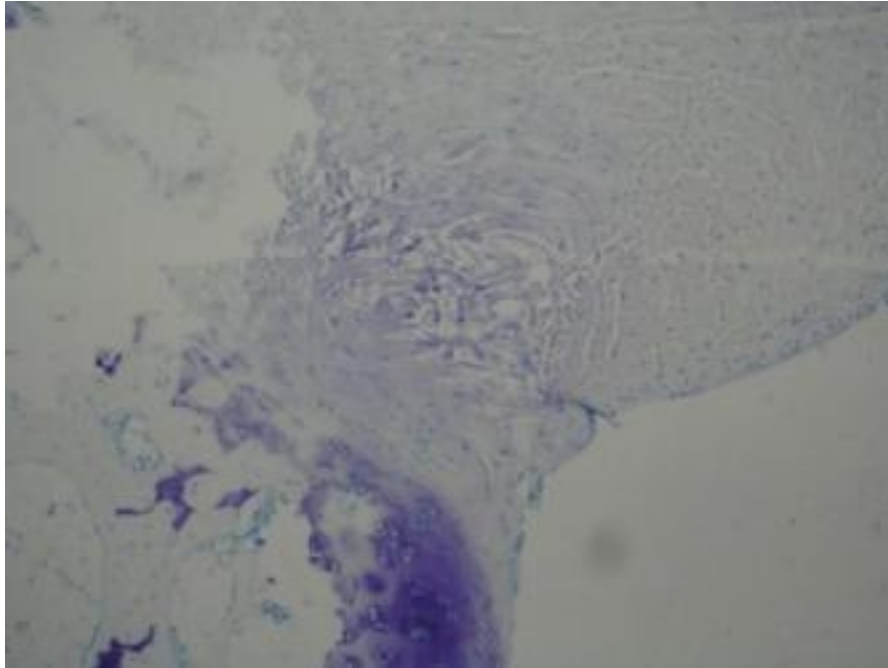
Resim 12: 40X (HE) B grubu defektin %25'inden azında radial dizilim gösteren (disorganize) kondrosit sütunları



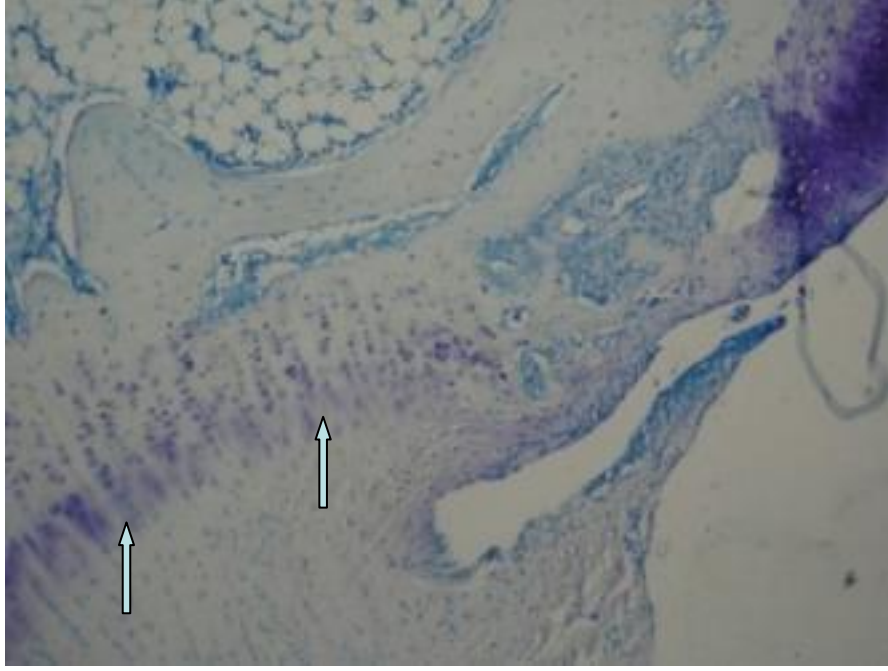
Resim 13: 40X (HE) C grubu iki nolu defekt ;defekti dolduran çoğunluğunu kondrosit morfolojisinde ve yuvarlak hücrelerin oluşturduğu ancak dizorganizasyon gösteren kondrositler.



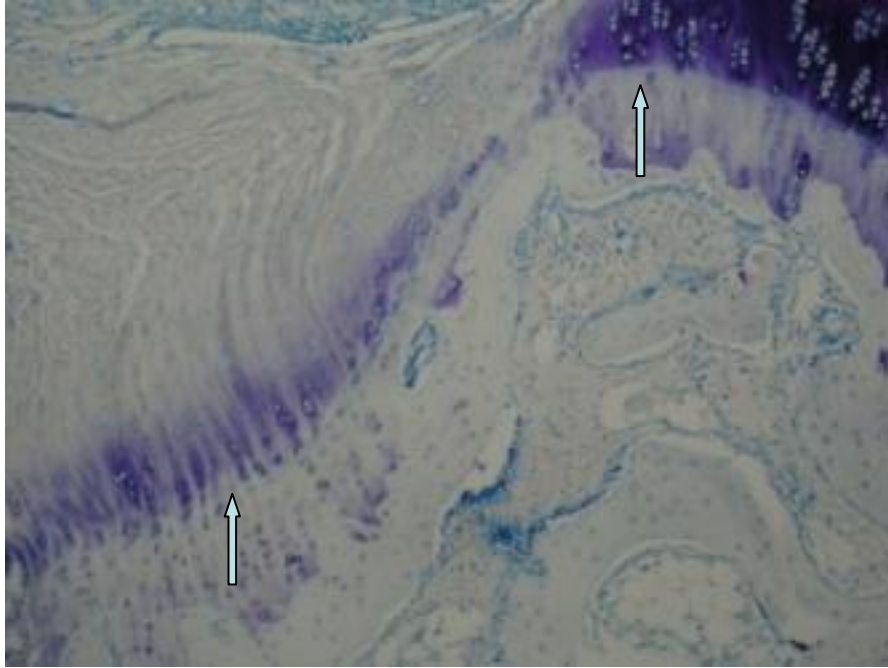
Resim 14: 40X (HE) C grubu bir nolu denek ; çoğunluğunu konrosit morfolojisinde yuvarlak hücrelerin oluşturduğu ve %25 ile %75'nin radial dizilim gösterdiği kondrositler.



Resim 15: 40X (TB) A grubu (kontrol grubu) ; gelişmekte olan fibrokartilajinöz dokuda matriks boyanmasının olmadığı görülmekte.



Resim 16: 40X (TB) B grubunda defektin % 25-75'inde radial dizilim gösteren kondrositlerde orta derecede azalmış matriks boyaması



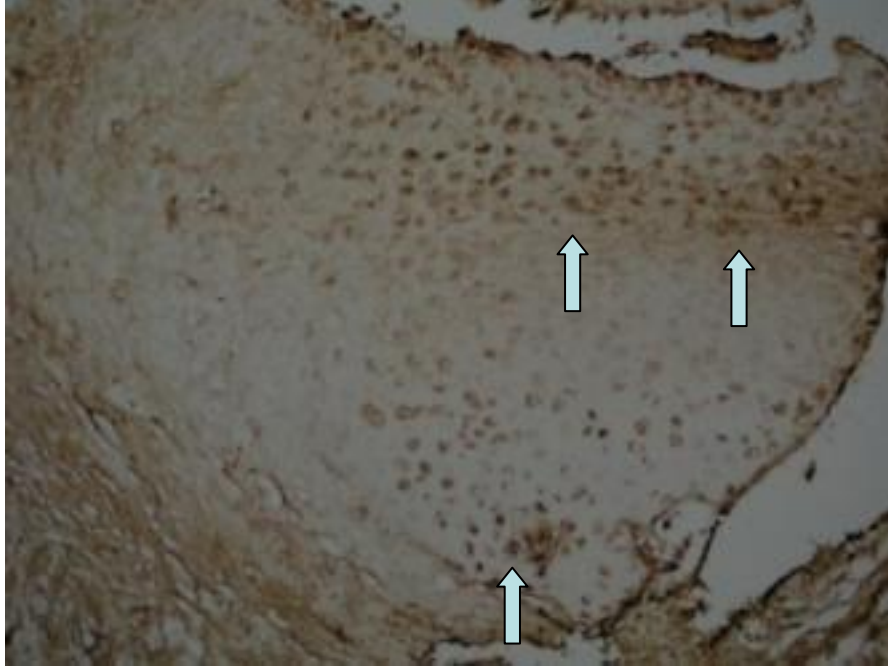
Resim 17: 40X (TB) C grubu (Kollajen sünger doldurulan ve lokal PDGF verilen grup) ; hafifçe azalmış kondroid matriks boyanması.



Resim 18: 40X, (kollajen Tip-II, İmmunohistokimyasal (İHK) boyama)
A grubu boyanma negatif



Resim 19: 40X, (kollajen Tip-II, İmmunohistokimyasal (İHK) boyama). B grubunda defekti dolduran disorganize az bir kısmı radial dizilim gösteren kondrositlerde orta şiddette Tip-II kollajen ekspresyonu .



Resim 20: 40X, (kollajen Tip-II, İmmunohistokimyasal (İHK) boyama). C grubu ; çoğunluğu radial dizilimde konositlerin oluşturduğu kuvvetli Tip-II kollajen ekspresyonu

TARTIŞMA

Eklem kıkırdağı, kondrositler, ekstraselüler matriks, su, kollajenler, nonkollajen proteinler ve proteoglikanlardan oluşur. Eklem hareketi için gerekli olan düşük sürtünme yüzeyini sağlar ve bunun için kıkırdağın yapısal bütünlüğü şarttır. Herhangi bir travma ya da osteoartrit sonucu oluşan hasarda sınırlı iyileşme kapasitesi olan bir dokudur. Uygulanan değişik teknikler, hasar sonrası tamir dokusu oluşturmada kısmen başarılı olmuştur; fakat eklem kıkırdağını oluşturan hyalin kıkırdağın biyomekanik fonksiyonunu ve histolojik yapısını, tam olarak yeniden oluşturabilecek tek bir ideal yöntem henüz geliştirilememiştir (16, 18, 44).

Bu çalışmada 62.5 ngr lokal PDGF emdirilmiş kollajen sünger uygulaması ile matür tam kat kıkırdak defektinde histolojik olarak iyileşme sağlandığı gözlemlenmiştir. Schmidt ve ark. (79) PDGF-BB'nin 4.7 ile 300 ngr arasındaki dozlarda, benzer şekilde kondrosit proliferasyonunu arttırdığını gözlemlemiştir. Bizim bulgumuz bu anlamda literatürle uyumludur.

Eklem kıkırdağı dayanıklılığını arttırdığı bilinen yüksek Tip-II kollajen oranının lokal PDGF uyguladığımız grupta immunohistokimyasal yöntemle yoğun olarak boyandığını tespit ettik. Çalışmamızda B grubundaki defektin immunohistokimyasal olarak Tip-II kollajen boyaması sonucu, orta şiddette boyandığı gözlenmiştir. Tuncel ve ark. (93) tavşan dizinde yaptığı çalışmada 4. ve 12. haftada kontrol ve IGF-I verilen grupların her ikisi birden immunohistokimyasal olarak Tip-II kollajen boyası ile boyanmıştır, 4. haftada fark görülmemiş ama 12. haftada IGF-I verilen grup çok daha kuvvetli Tip-II kollajen boyanması gözlenmiştir. Fujimoto ve ark. (34) yine tavşanlarda yaptığı çalışmanın bir yıllık sonuçlarını yayınlamış ve kontrol grubunda defektin hem yüzeysel hem de derin kısımlarında Tip-II kollajen boyası ile boyanma göstermiştir. Bununla birlikte Sellers ve ark. (82) Tip-II kollajen için kantitatif

immunohistokimyasal boyamada, onarım kıkırdağı ve normal komşu kıkırdak arasında, rhBMP-2 ile tedavi edilen ve edilmeyen defektler arasında farklılık saptamamışlardır.

PDGF uyguladığımız grupta histolojik skor 11.00 ± 1.67 iken, tedavi uygulanmayan grupta bu değer 23.00 ± 2.37 bulundu ($p < 0.001$). Bu sonuçla lokal PDGF uygulamasının sınırlı tam kat kıkırdak lezyonlarında başarıyla uygulama alanı bulabileceği kanısındayız. Sellers'in modifiye histolojik skora sistemi genel kabul görmüş bir skora sistemi olmasından dolayı bu yöntem kullanıldı (34, 79, 81, 82, 93). Sellers ve ark. (81, 82) 6 aylık çalışmalarında rhBMP-2 tedavi uygulanan grupta histolojik skor 8.6 ± 4.1 ve 1 yıllık çalışmada 9 ± 2.71 olarak anlamlı bulmuşlardır. Aynı yazarlar 1 yıllık çalışmada ise histolojik skoru kontrol grubunda 14.30 ± 5.58 olarak bulmuşlardır ($p < 0.05$). Tuncel ve ark. (93) 12. hafta sonunda IGF-I ile tedavi edilen grupta histolojik skoru 5.5 (4-9) ve kontrol grubunda 12 (8-17) bulmuşlardır ($p < 0.05$).

Hayvan modelinde sağ diz medial femoral kondilde tam kat hasar oluşturduk. Medial femoral kondili, eklemin yük binen kompartmanı olması nedeniyle tercih ettik. Median parapatellar insizyon sonrası patellayı laterale devirerek medial femoral kondilde defekt oluşturduk. Diz ekleminin anatomik yapısı, hareketli olması, biyomekanik özellikleri, cerrahi erişim ve açılımının kolay olması tercih edilmesinin başlıca sebepleridir. Literatürde yer alan pek çok çalışmada diz eklemi ve defekt alanı olarak medial femoral kondil kullanılmıştır (40, 58, 72, 93). Bununla birlikte bazı otörler; patello-femoral eklem ya da interkondiler olukta defekt oluşturmuşlardır (27, 30, 34, 84). Tüm bu çalışmalarda defekt boyutu bizim çalışmamıza benzer şekilde dört ila altı milimetre çapındadır. Fortier (30), atların patello-femoral ekleminde kıkırdak iyileşmesini çalışmış ve atlardaki kıkırdak iyileşme sürecinin, diğer küçük hayvanlara nazaran daha yavaş ilerlediğini, iyileşme safhalarının insan kıkırdağı ile daha fazla benzeştiğini savunmuştur. Sellers ve ark. ise troklear olukta tam kat kıkırdak defektleri oluşturmuşlardır (81, 82).

Biz çalışmamızda vücutta reaksiyon yapmadığı için kollajen sünger kullandık (Tip-I kollajen). Çalışmamızda doku reaksiyonu ve sinovit bulgularına rastlanmadık. B ve C gruplarında defektleri tip I kollajen süngeri ile kapatmamızın amacı, hayvanda yabancı doku reaksiyonuna yol açmadan, hücre migrasyonu ve proliferasyonu için bir iskelet yapı sağlamaktır. Ayrıca kollajen sünger, lokal PDGF ile tedavi edilen grupta etken maddenin defekt alanında kalması için destek görevi yaptı. Tuncel ve ark. da (93) tavşan diz eklemi kırıldak defektlerinde IGF-I ile tedavi edilen tavşanlarda bizim çalışmamızda olduğu gibi kollajen sünger kullanmışlardır. Çünkü kollajenin yüksek düzeyde absorbe olan ve biyolojik olarak uyumlu bir materyal olduğu bilinmektedir. Wakitani (100), tavşan diz eklemi kırıldak defektlerine "Hepatocyte Growth Factor (HGF)" ve kontrol grubu için salin solüsyonu verirken defekti bizim çalışmamızda olduğu gibi kollajen sünger ile doldurmuştur. Nixon (68) atların patello-femoral eklemlerinde yaptığı çalışmada defekt alanına lokal IGF-I uygulamış ve bunu otojen fibrin yapıda pıhtılarla desteklemiştir. Fujimoto (34), tavşanların diz eklemlerindeki kırıldak defektlerine "bFGF" uygularken, sığır aşil tendonundan elde edilmiş kollajen süngeri, "bFGF"ün taşıyıcısı olarak kullanmıştır. Araştırmacı, bir başka grupta da taşıyıcı olarak kollajen jel kullanmıştır. Sonuçta kollajen sünger'in hücre göçünü inhibe edebileceğini, kollajen jel kullanımının daha yararlı olduğunu bildirmiştir. Fujimoto'nun bulgularına göre, kullanılan kollajen süngerin absorpsiyon özelliği fazladır (34). Çalışmamızda, kullanılan kollajen sünger sakrifikasyon sonrası onikinci haftada tüm vakalarda rezorbe olmuştu.

Yapılan *invivo* çalışmaların tamamına yakınında, dışardan verilen büyüme faktörü defekt alanına lokal uygulandığından biz de PDGF'yi lokal olarak uyguladık (7, 26, 34, 41, 49, 68, 76, 81, 82, 85, 93, 100). Nixon, atların diz eklemlerindeki kırıldak defektlerine 25µg. IGF-I uygulamıştır (68). Sellers ve ark. bizim çalışmamıza benzer şekilde 5 µgr rhBMP-2

emdirilmiş kollajen sünger doldurmuşlardır (81, 82). Yine Fujimoto ve ark tam kat osteokondral defektin içine bFGF emdirilmiş kollajen sünger ile doldurmuştur (34). Tuncel ve ark. tam kat osteokondral defekti 5µ gr rekombinant IGF-I emdirilmiş kollajen sünger ile doldurmuştur (93). Tüm adı geçen çalışmalarda oluşturulan tam kat kırıkta lezyonlarında belli oranda iyileşme sağlandığı bildirilmiştir.

Bizim çalışmamızın zayıf noktalarından biri tek bir zaman diliminde çalışmaktı (12 hafta); hayvan sayısı artırılarak farklı zaman dilimlerini içeren gruplar oluşturulması çalışmamızı daha güçlü kılabilirdi.

Üç ayın kırıkta iyileşmesinin tamamlanmasında sınır olan bir süre olduğu düşünülerek çalışmamıza 12. haftada son verildi. Nitekim bu sürede hyalin benzeri kırıkta oluşumunu ve Tip-II kollajenin oluşumunu gördük. Yine sürenin yetersizliği nedeniyle osteofitleri görmedik kanısındayız. Sellers'in 1 yıllık çalışmasında bizim çalışmamızdan farklı olarak boş defekti olan eklemlerin %12.5'inde, kollajen sünger ile tedavi edilen eklemlerin %62.5'unda ve kollajen sünger emdirilmiş rhBMP-2 ile tedavi edilen hastaların %66.7'sinde küçükle orta boy arasında büyüklüğü değişen osteofitler gözlemlendi. Tüm osteofitler insizyon bölgesindeki troklear oluşun medial bölümünde lokalize idi (82).

Bizim çalışmamızda makroskobik olarak C grubundaki (lokal PDGF içeren kollajen sünger) defektteki onarım dokusunun yüzeyi A ve B grubundaki defekte göre daha düz ve düzenliydi. Sellers ve ark. çalışmasında bizim çalışmamıza benzer şekilde rhBMP-2 ile yapılan çalışmaya benzer şekilde boş bırakılan ve kollajen sünger ile doldurulan gruba göre rhBMP-2 emdirilmiş kollajen sünger ile tedavi edilen grupta defekt daha düz ve düzenliydi (81, 82).

Çalışmamızda her üç grup içinde modifiye histolojik değerlendirme skoruna göre yaptığımız değerlendirmede gruplar arasındaki farkı belirlemek için Mann-Whitney-U ve grup içi histopatolojik farklılıkları incelemek için Kruskal-Wallis Testi kullanılarak, her 3 grup arasında

kategorilerdeki histolojik değişiklikler saptandı ve $P < 0,05$ olan değerler anlamlı kabul edildi. 3 grubun Kruskal Wallis istatistik yöntemi ile yaptığımız istatistik çalışmasında kategoriler arasında 4. kategori (4.kategori de; hücrel morfoloji değerlendirildi) ve 5. kategori (Tüm defektin yapısı (sınırlar dahil olmadan)) hariç diğer 6 kategoride istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edildi ($P < 0.05$). Bunun sebebi 12 haftanın yetersiz olması olabilir.

A grubunda defekt yapısı, defektin dolması, onarım dokusunun çevre kıkırdak ile uyumu ve yeni subkondral kemik gelişimi (Kategori 1, 2 ve 7) bütün hayvanlarda yüksek sonuç elde edildi. A grubunun makroskopik yapısı 12.haftanın sonunda bulutlu beyazdı ve sınırları belirsizdi. Mikroskopik olarak toluidin mavisi ile gelişmekte olan fibrokartilajenöz dokuda matriks boyanmasının olmadığı görüldü. A grubunda HE ile yapılan boyamada eklem defektini dolduran çoğu yuvarlak kondrosit morfolojisinde fibrokartilajenöz doku görüldü. Bu bulgular Fujimoto ve ark. çalışması ile uyumludur (34).

B grubunun makroskopik görüntüsü 12. haftada tamir kıkırdağının rengi ve yapısı bitişiğindeki normal kıkırdağa çok benziyordu. Defektler hemen hemen tümüyle hyalin kıkırdak alanları ile doluydu ve düzenli doku ile iyi bir devamlılık vardı. Bizim çalışmamızdan farklı olarak 12. hafta sonunda Tuncel ve ark. (93) çalışmasında kontrol grubunda, yani kollajen sünger ile doldurulan ve spontan iyileşmeye bırakılan matür ve immatür tavşanların makroskopik görüntüsü defektin yüzeyi donuk ve irregülerdi ve rengi beyaz ile pembe arasındaydı ve çoğu defekte yüzey düzensizliği devam ediyordu. Fujimoto ve ark. (34) çalışmasında kollajen sünger doldurulup spontan iyileşmeye bırakılan grupta 12. haftada bizim çalışmamızdan farklı olarak kollajen süngere rağmen defekt makroskopik olarak kahveringimsi olarak izlendi.

B grubunda mikroskopik olarak 5. kategori (Tüm defektin yapısı (sınırlar dahil olmadan)) hariç diğer tüm kategorilerde A grubuna oranla istatistiksel olarak histolojik parametrelerde belirgin düzelme olduğu dikkati çekti. Tuncel ve ark.(93) çalışmasındaki

kontrol grubunda bizim çalışmamızdan farklı olarak 12. haftada defekt fibrokartilaj doku ile kaplanmış ve irregüler yüzeyli olup orijinal dokuyla zayıf benzerlik bulunduğu belirtilmiştir. Tidemark oluşumu ortalama %55'lik defektlerde görüldü. Sellers'in histolojik skorlama sistemine göre farklılıklar yukarıda adı geçen çalışmanın kontrol grubunda matriks boyaması, hücre morfolojisi ve yeni tidemark oluşumu bakımından değişik haftalarda farklılık vardı. Bu çalışmada, spontan iyileşmeye bırakılan immatür ve matür kırıkdağlarda histolojik iyileşme açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmediği bildirilmiştir. Sadece histolojik puanlamada "Kategori 4" olarak değerlendirilen hücre morfolojisi karşılaştırılmasında immatür kırıkdağ 12. haftanın sonunda, normal kondrosit morfolojisine yakın özellikte tamir hücreleri içermesi nedeniyle daha iyi olarak değerlendirilmiştir. Sellers ve ark. rhBMP-2 ile yaptıkları 1 yıllık çalışmada kontrol grubu ve kollajen sünger tampon ile tedavi edilen defektler arasında herhangi bir bireysel kategoriye veya bileşik skora göre belirgin bir farklılık bulunmadığını bildirmişlerdir (82).

Çalışmamızda yeni subkondral kemik oluşumu için, lokal PDGF uygulanan grupta bir hayvan hariç hepsinde 1 puan (%75-89) verilmiştir, ancak Tuncel ve ark. IGF-I ile tedavi edilen bu grupta 12 haftanın sonunda %88-100 arasında bulmuşlardır. Çalışmamızda A grubunda 3 ve 4 puan, B grubunda ise 2 veya 3 puan (yani %25-74) arasında alan subkondral kemik oluşumu, Tuncel'in serisinde kontrol grubunda %58-94 arasında bildirilmiştir (93).

Kubo (52), immatür ratların femoral kondillerinde kırıkdağ defekti oluşturmuş ve 1-48 hafta arasında spontan iyileşmelerini rapor etmiştir. Araştırmacıya göre, 12. haftadan itibaren tamir dokusu, çevre sağlam kırıkdağ ile benzeşir ve tamir dokusundaki hücreler, kondrositlerden ayırt edilemeyecek morfolojik özelliktedir.

B grubundaki defektin 12. hafta sonunda Toluidin mavisi ile boyandığında defektlerin %25-75'inde radial dizilim gösteren kondrositlerde orta derecede azalmış matriks boyanması

tesbit edildi. Yine çalışmamızda B grubundaki defektin immunohistokimyasal olarak Tip-II kollajen boyaması sonucu orta şiddette Tip-II kollajen ekspresyonu gözlemlendi. Tuncel ve ark (93). çalışmasında 4. haftada kontrol ve IGF-I verilen gruplar her ikisi birden Tip-II kollajen boyası ile immunohistokimyasal olarak boyanmıştır, ama 12.haftada IGF-I verilen grup çok daha kuvvetli Tip-II kollajen ekspresyonu gözlenmiştir. Tuncel ve ark. çalışmasında Toluidin mavisi ile matriks boyanması IGF-I verilen grupta 8. ve 12. haftada kontrol grubuna oranla çalışmamıza benzer şekilde iyi matriks boyanması gözlenmiştir (93). Tuncel (93) immatür ve matür tavşanlarda, Shida (85) immatür ratların diz eklemlerinde defekt oluşturmuş ve PCNA (proliferating cell nuclear antigen) boyası ile immunohistokimyasal olarak boyandığını göstermişlerdir.

Nixon (68), atların patellofemoral eklemlerinde defekt oluşturmuş ve IGF-I ile tedavi edilen grubun kontrol grubuna oranla kondrosit organizasyonunu (kategori 4) daha iyi olduğunu saptamıştır.

Wakitani (100), tavşan diz eklemlerinde osteokondral defekt oluşturarak bir grubun dizine IGF-I'e yapı olarak çok benzeyen HGF, diğer grubun dizine ise salin solüsyonu enjekte etmiştir. Altı ay sonra defektleri incelediğinde, çalışmamıza benzer şekilde HGF verilen grupta defekt dolumunun daha iyi olduğunu, tüm makroskobik ve histolojik bulguların büyüme faktörü verilen grupta daha iyi olduğunu bildirmiştir.

Neidel (67), 1992'de tavşan dizinde tam kat defektlerine IGF-I, EGF, FGF uygulamış ve tüm bu çalışmaların aksine büyüme faktörlerinin hücre replikasyonu, proteoglikan sentezini ve defekt dolumunu stimüle etmediğini rapor etmişlerdir.

Van Susante ve ark. (98), sığır kondrositlerinde büyüme faktörlerine olan cevapsızlığın değişik serum konsantrasyonlarında invitro araştırmışlar ve yeni tamir kırıkdağı oluşumunda

büyüme faktörlerinin rolü olabileceğini tesbit etmişlerdir.

C grubunda ise tüm kategorilerde hem A hem B grubundan daha olumlu sonuçlar elde edildi. Fakat hücrel morfoloji (kategori 4) ve 5.kategori (Tüm defektin yapısı) hem gruplar arasında hem de aynı grup içerisindeki değişik hayvanlar arasında birbirinden farklılıklar göstermekteydi. Tuncel ve ark. çalışmasında bizim çalışmamızdan farklı olarak 12. haftanın sonunda kontrol grubu ve IGF-I grubu istatistiksel olarak karşılaştırıldığında kategori I, V ve VIII de farklılıklar vardı (93). Sellers ve arkadaşlarının çalışmasında rhBMP-2 ile tedavi edilen defektlerin skorları kenarda bütünleşme (kategori 2), hücrel morfoloji (kategori 4), tüm defektin yapısı (sınırlar dahil olmadan) (kategori 5) ve tidemarkta yeniden şekillenme (katogori 8) tedavi edilmeyenlere göre belirgin şekilde daha üstündü ($P<0.05$). rhBMP-2 ile tedavi edilen defektlerin total skorları tedavi edilmeyen defektlere göre anlamlı derecede daha iyiydi ($P<0.05$), bu daha iyi bir histolojik görünümü ifade etmekteydi . Sellers'in çalışmasında 4 ve 5 kategoride düzelme olması 12 haftanın bu kategorilerin düzelmesi için yeterli olmadığını göstermektedir (82).

Bizim lokal PDGF emdirilmiş kollajen sünger ile tedavi ettiğimiz grubun histolojik değerlendirmesinde 4. kategorinin histolojik skorlamasında grup içerisindeki denekler genellikle 2 (Kondrosit morfolojisi taşıyan yuvarlak hücreler çoğunlukta: Sütunlar şeklinde radial zone'un %25 ten azı (dezorganize)) veya 3 (Kondrosit morfolojisi taşıyan yuvarlak hücreler %50 ise; Sütunlar seklinde radial zone'un %25-%75' i) puanla değerlendirilmiştir. Bizim çalışmamızdan farklı olarak Sellers ve ark. çalışmasında lokal rhBMP-2 emdirilmiş kollajen sünger ile tedavi edilen grubun histolojik değerlendirmesinde 4. kategorinin histolojik skorlaması rhBMP-2 ile tedavi edilen defektler için skorlar 1 puan (çoğunlukla kondrosit morfolojisi taşıyan yuvarlak hücreler ve sütunlar şeklinde radial zone'un %25-75) ile 2 (çoğunlukla kondrosit morfolojisi taşıyan yuvarlak hücreler ve sütunlar şeklinde radial zone'un %25 ten azı) puan arasındaydı (81, 82). rh BMP-2 emdirilmiş kollajen sünger ile tedavi edilen 4.

katerogoride tanımlanan skorlar belirgin şekilde düzelmiş olmasına rağmen rhBMP-2 ile tedavi edilen defektlerin herhangi bir kategoride 0 puanlık bir skoru mevcut değildi (82).

Çalışmamızın C grubu histolojik değerlendirmesinde 5. kategorideki deneklerin grup içerisinde üç denek'e 1 (1-3 küçük boşluk), iki denek'e 2 (3 büyük boşluk) ve bir denek'e 3 (3 ten fazla büyük boşluk) puan verildi. A ve B grubunda ise puanlar 2, 3 ve 4 (Yarılma ya da fibrilasyon mevcut olması) arasında değişti. Oysa bizden farklı olarak Sellers ve arkadaşlarının çalışmasında rhBMP-2 ile tedavi edilen dokuz defektin beşinde defektte kategori 5 açısından normalken, boş defektlerle veya kollagen sünger ile doldurulan defekt ile dolduranların sadece onaltı defektin dördünde normal olarak görüldü (82).

Lokal PDGF ile yaptığımız bu çalışmada kontrol grubu ile kıyaslandığında kategori 4 ve 5 haricinde bütün parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı sonucun çıkması, Schmidt ve ark. ortaya koydukları PDGF'nin fibroblastları, osteoblastları ve kondrositleri içeren mezenkimal orijinli hücrelerin potent bir mitojenik ve kemotaktik faktör olduğu ve böylece doku rejenerasyonunu ve onarımını artırma yeteneğine sahip olduğu sonucunu desteklemektedir; yine aynı çalışmada belirtilen PDGF reseptörleri kondrositleri içeren bir takım hücre tipleri üzerinde tanımlanmıştır ve reseptörlerin sayısı IL-1 gibi inflamatuvar sitokinlerin varlığıyla düzenlenmektedir sonucunu desteklemektedir (79).

Sonuç olarak PDGF'nin lokal taşıyıcılarla kombine edilerek güvenle uygulanabileceğini, ancak benzer kondrojenik etkili büyüme faktörlerinin bir kokteyl olarak uygulanmasını araştıran çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

SONUÇ

1. Lokal PDGF emdirilmiş kollajen süngerle tedavi edilen tam kat osteokondral defektler kontrol grubunda oluşturulan defektlere göre daha komplet dolmuş ve subkondral kemiğe daha iyi tutunmuştur.
2. Lokal PDGF, tam kat osteokondral defektin makroskopik ve mikroskopik düzeyde orijinale yakın seviyede iyileşmesine katkıda bulunmuştur.
3. Lokal PDGF ile tedavi edilen tam kat kırıkta defektlerinde Tip-II kollajen oluşumu daha iyi düzeydedir. Bu da oluşan kırıkta kontrol grubuna göre dayanıklılığının daha fazla olacağını göstermektedir.
4. Lokal PDGF uygulamasının bir taşıyıcı (Tip-I kollajen) ile beraber kullanılması tam kat kırıkta defektlerinin iyileşmesinde olumlu katkı yapmıştır.
5. Lokal PDGF uygulamasının matriks oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Aksoy B, Olcay E, Yeşiltepe R, Özsoy S, Şirvancı M, Savcı N, Bülbül M, Kara AN: İzole osteokondral lezyonların mozaikoplasti yöntemi ve fasya lata grefti kullanımı ile tedavisi ve karşılaştırmalı sonuçları. *Acta Orthop Traumatol Turc*, 32:219-225, 1998.
2. Aston JE, Bentley G.: Repair of Articular surfaces by allografts of articular and growth plate cartilage. *J Bone Joint Surg*, 68 B:29-35, 1986.
3. Athanasiou K, Niederauer G, Agrawal CM: Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials*, 17:93-102, 1996.
4. Atik OS, Takka S, Satana T, Kanatlı U, Bayar A, Senkoğlu A: Osteokondral multipl otogreft transferi. *Artroplastisi ve Artroskopik Cerrahi Dergisi*, 7:1-2, 1996.
5. Atik, OŞ, Vural A.M., Sarban S, Üzümcügil O, Bayar A, Dağlar B: Total diz protezi ve patellada osteokondral multipl otogreft transferi. *Artroplastisi Artroskopik Cerrahi Dergisi*, 8:11-12, 1997.
6. Bancroft J, Stevens A: *Theory and practice of histological techniques*. 3rd edition. Churchill Livingstone, 316-317, 1990.
7. Bonassar Lj, Grodzinsky AJ, Frank EH, Davilla SG, Bhaktav NR: The effect of dynamic compression on the response of articular cartilage to insulin like growth factor-I. *J Orthop Res*, 19:11-17, 2001.
8. 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 J Surg*, 79 A:1439-1451, 1997.
9. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L: Treatment of

- deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *New Eng J Med*, 331-14:889-895, 1994.
10. Brittberg M, Faxen E, Peterson L: Carbon fiber scaffolds in the treatment of early knee arthrosis. A prospective 4-year follow-up 37 patients. *Clin Orthop Rel Res*, 307:155-164, 1994.
 11. Brittberg M, Nilsson A, Lindahl A, Ohlsson C, Peterson L: Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. *Clin Orthop Rel Res*, 326:270-283, 1996.
 12. Brittberg M: Autologous chondrocyte transplantation. *Clin Orthop Rel Res*, 367S:147-156, 1999.
 13. Brown GL, Curtsinger L, Jurkiewicz MJ et al. Stimulation of healing of chronic wounds by epidermal growth factor. *Plast Reconst Surg*, 88:189-196, 1991.
 14. Buckwalter JA, Mow VC: Cartilage Repair in Osteoarthritis. in: Moskowitz RW, Howe U DS, Goldbert VM, Mankin HJ, eds. *Osteoarthritis: Diagnosis and Medical/ Surgical Management*. 2nd ed. Philadelphia, WB Saunders Co, 71-107, 1992.
 15. Buckwalter JA, Lane NE: Aging, sports and osteoarthritis. *Sports Med Arthros*, 4:276-287, 1996.
 16. Buckwalter JA, Mankin HJ: Articular Cartilage Part I: Tissue Design and Chondrocyte-matrix Interactions. *J Bone Joint Surg*, 79-A: 600-608, 1997.
 17. Buckwalter JA, Mankin HJ, Articular Cartilage Part I: Tissue design and chondrocyte interactions. *J Bone J Surg*, 79-A:600-611, 1997.
 18. Buckwalter JA, Mankin HJ, Articular Cartilage Part II: Degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation *J Bone Joint Surg*, 79 A:612-

- 627, 1997.
19. Buckwalter JA, Mankin HJ, Articular cartilage repair and transplantation. *Arthritis Rheum*, 41:1331-1342. 1998.
 20. Buckwalter JA: Evaluating methods of restoring cartilaginous articular surfaces. *Clin Orthop Rel Res*, 367S:224-238, 1999.
 21. Buckwalter JA, Coutts R, Hunziker E, Mow VC: Breakout Session 3: Articular Cartilage. *Clin Orthop Rel Res*, 367S:239-243, 1999.
 22. Buckwalter JA: Current understanding of osteoarthritis. In symposia handouts 1999, AAOS 66th Annual Meeting Proceedings, 417-421, 1999.
 23. Caplan AI, Goldberg VM: Principles of tissue engineered regeneration of skeletal tissues. *Clin Orthop Rel Res*, 367S:12-16, 1999.
 24. Chen AC, Nagrampa JP, Schinagl RM, Lottman LM, Sah RL: Chondrocyte transplantation to articular cartilage explants in vitro. *J Orthop Res*, 15:791-802, 1997.
 25. Cheung HS, Lynch KL, Johnson RP, Brewer BJ: In vitro synthesis of tissue specific type I collagen by healing cartilage. *Arthritis and rheumatism*, 23:211-219, 1980.
 26. Cuevas P, Burgos J, Baird A: BFGF promotes cartilage repair in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 156:611-618, 1988.
 27. Dahlberg L, Kreichbergs A: Demineralized allogenic bone matrix for cartilage repair. *J Orthop Res*, 9:11-19, 1991.
 28. Daughaday WH, Salmon WD Jr, Hail K, Raben M: Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature*, 235:107-108, 1972.
 29. Ephrat BM, Robinson D, Mendes DG, Halperin N, Nevo Z: Resurfacing of goat

- articular cartilage by chondrocytes derived from bone marrow. *Clin Orthop Rel Res*, 330:234-243, 1996.
30. Fortier LA, Nixon AJ, Balkmann C, Sandell YE: IGF-I gene expression patterns during repair of acute articular cartilage injury. *J Orthop Res*, 19:720-8, 2001.
 31. Freed LE, Marquis JC, Nohria A, Emmanuel J, Mikos AG, Langer R: Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. *J Biomed Mater Res*, 27:11-23, 1993.
 32. Freed LE, Martin I, Vunjac-Novakovic G: Frontiers In Tissue Engineering: In vitro modulation of chondrogenesis. *Clin Orthop Rel Res*, 367S:46-58, 1999.
 33. Frenkel SR, Toolan B, Menche D, Pitman M, And Panchence JM, Chondrocyte transplantation using a collagen bilayer matrix for cartilage repair. *J Bone J Surg*, 79 B:831-836, 1997.
 34. Fujimoto E, Ochi M, Kato Y, Sumen Y: Beneficial effect of basic fibroblast growth factor on the repair of full-thickness defects in rabbit articular cartilage. *Arch Orthop Trauma Surg*, 119:139-145, 1999.
 35. Furukawa T, Eyre DR, Koide S, Glimcher MJ. Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *J Bone Joint Surg*, 62 A:79-89, 1980.
 36. Grande DA, Halberstadt C, Naughton G, Schwartz R, Manji R: Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering articular cartilage grafts. *J Biomed Mater Res*, 34:211-220, 1997.
 37. Grande DA, Breitbart AS, Mason J, Paulino C, Laser J, Schwartz RE: Cartilage tissue

- engineering: Current limitations and solutions. *Clin Orthop Rel Res*, 367S: 176-185, 1999.
38. Green WT Articular cartilage repair: Behavior of rabbit chondrocytes during tissue culture and subsequent allografting. *Clin Orthop Rel Res*, 124:237-250, 1977.
39. Hovinga GN, Buma P, Koot HWJ, Van Der Kraan PM, Van Den Berg WB: Chondrocyte behavior in fibrin glue in vitro. *Acta Orthop Scand*, 64:441-445, 1993.
40. Hunziker EB, Rosenberg LC: Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg*, 78 A:721-733, 1996.
41. Hunziker EB, Driesang MK, Morris EA: Chondrogenesis in cartilage repair is induced by members of the TGF- β superfamily. *Clin Orthop Rel Research*, 391:171-181, 2001.
42. Hutmacher DW: Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21:2529-2543, 2000.
43. Isogai N, Landis W, Kim TH, Gerstenfeld LC, Upton J, Vacanti JP: Formation phalanges and small joints by tissue engineering. *J Bone J Surg*, 81 A:306-316, 1999.
44. James E. Gilbert: Current Treatment Options for the Restoration of Articular Cartilage. *The American Journal of Knee Surgery*, 11:42-46 1998.
45. Jingushi S, Izumi T, Kinoshita T, Tamura M, Iwaki A, Shida J.: A combination treatment with basic fibroblast growth factor and perichondrium autograft for a fullthickness articular cartilage defect. *Orthop Res Soc*, 40:327-336, 1994.
46. Johansson AG.: Clinical studies on the role of GH and IGF-1 in bone metabolism. Uppsala Universty Press: Uppsala Sweden, 7-13, 1995.

47. Kandel RA, Boyle J, Gibson G, Cruz T, Speagle M: In vitro formation of mineralized cartilagenous tissue by articular chondrocytes. *In Vitro Cell Dev Biol*, 33:174-181, 1997.
48. Kawabe N, Yoshinao M: The repair of full-thickness articular cartilage defects. *Clin Orthop Rel Res*, 268:279-293, 1991.
49. Kingsley DM, Bland AE, Grubber JM: The mouse short ear skeletal morphogenesis locus is associated with defects in a bone morphogenetic member of the TGF- β 3 superfamily. *Gene Develop*, 8:133-146, 1994.
50. Khan SN, Bostrom MPG, Lane JM: Bone growth factors. *Orthopedic Clinics of North America*, 31:375-387, 2000.
51. Kim WS, Vacanti JP, Cima L, Mooney D, Upton J, Puciac WC, Vacanti CA: Cartilage engineered in predetermined shapes employing cell transplantation on synthetic biodegradable polymers. *Plast Reconstr Surg*, 94:233-237, 1994.
52. Kubo T: Ultrastructural studies of healing process of injured articular cartilage. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi*, 57:167-185, 1983.
53. Laato M, Heino J, Kahari VM: Epidermal growth factor prevents methylprednisolone induced inhibition of wound healing. *J Surg Res*, 17:354-359, 1989.
54. Lawrence WT, Diegelmann RF: Growth factors in wound healing. *Clinics in Dermatology*, 12:157-169, 1994.
55. Lebaron RG, Athanasiou KA: Ex vivo synthesis of articular cartilage. *Biomaterials*, 21:2575-2587, 2000.
56. Mankin MJ, Mow VC, Buckwalter JA: Form and Function Articular Cartilage. In: Simon SR ed. *Orthopaedic Basic Science Rosemont III: American Academy of*

- Orthopaedic Surgeons, 1-44, 1994.
57. Messner K, Gillquist J: Synthetic implants for the repair of osteochondral defects of the medial femoral condyle: A biomechanical and histological evaluation in the rabbit knee. *Biomaterials*, 14:513-521, 1993.
 58. Messner K, Gillquist J: Cartilage repair. *Acta Orthop Scand*. 67:523-529, 1996.
 59. Mollenhauer J, Kuettner KE: Articular Cartilage. In: Dee R. ed. *Principles of Orthopaedic Practice*. 2nd edition. McGraw-Hill, 85-98, 1997.
 60. Mooney DP, O'Reilly, Gamelli RL: Tumor necrosis factor and wound healing. *Ann Surg*, 211:124-129, 1990.
 61. Moskalewski S: Transplantation of isolated chondrocytes. *Clin Orthop*, 272:16-20, 1991.
 62. Mow VC, Proctor CS, Kelly MA: Biomechanics of articular cartilage, in Hordín M, Frankel VH eds.: *Basic Biomechanics of the Musculoskeletal System*, ed 2.
 63. McGee GS, Davidson JM, Buckley A: Recombinant basic fibroblast growth factor accelerates wound healing. *J Surg Res*, 45:145-153, 1988.
 64. Muckle DS, Minns R: Biological response to woven carbon fibre pads in the knee. a clinical and experimental study. *J Bone Joint Surg*, 72 B:60, 1989.
 65. Nakahara H, Goldberg VM, Caplan A: Culture expanded human periosteal derived cells exhibit osteochondral potential in vivo. *J Orthop Res*, 9:465-476, 1991.
 66. Nehrér S, Breinan HA, Ramappa A, Shortkroff S, Young G, Minas T, Sledge CB, Yannas IV, Spector M: Canine chondrocytes seeded in type I and type II collagen implants investigated in vitro. *J Biomed Mat Res*, 38:95-104, 1997.
 67. Neidell JJ: No improvement of joint cartilage healing after trauma by the administration of insulin like growth factor-1, epidermal growth factor and fibroblast

- growth factor in rabbits. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*, 130:73-78, 1992.
68. Nixon AJ, Fortier LA, Williams J, Mohammed H: Enhanced repair of extensive articular defects by insulin like growth factor-1-laden fibrin composites. *J Orthop Res*, 17:475-487, 1999.
69. O'Driscoll SW, Keeley FW, Salter RB: The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. *J Bone Joint Surg*, 68 A:1017-1035, 1986.
70. O'Driscoll SW: Articular cartilage regeneration using periosteum. *Clin Orth Rel Res*, 367S:186-203, 1999.
71. Perka C, Sittlinger M, Schultz O, Spitzer RS, Schlenzka D, Burmester GR: Tissue engineered cartilage repair using cryopreserved chondrocytes. *Clin Orthop Rel Res*, 378:245-254, 2000.
72. Pineda S, Pollack A, Stevenson S, Goldberg V, Caplan A: A Semiquantitative scale for histologic grading of articular cartilage repair. *Acta Anat*, 143:335-340, 1992.
73. Poehlman ET, Copeland KC: Influence of physical activity on IGF-1 in healthy younger and older man. *J Clin Endocrinol Metab*, 71:1468-1473, 1990.
74. Richardson JB, Caterson B, Evans EH, Ashton BA, Roberts S: Repair of human articular cartilage after implantation of autologous chondrocytes. *J Bone J Surg*, 81 B:1064-1068, 1999.
75. Robson MC, Phillips LG, Lawrence WT: The safety and effect of topically applied recombinant basic fibroblast growth factor on the healing of chronic pressure sores. *Ann Surg*, 216:401-406, 1992.
76. Rogachefsky RA, Dean DD, Howell DS, Altman RD: Treatment of canine

- osteoarthritis with IGF-1 and sodium pentosan polysulfate. *Osteoarthritis and Cartilage*, 105-114, 1993.
77. Rubak JM, Poussa MM, Ristila V: Chondrogenesis in repair of articular cartilage defects by free periosteal grafts. *Acta Orthop Scand*, 53:181-186, 1982.
78. Salmon WD Jr, Daughaday WH: A hormonally controlled serum factor which stimulates sulphate incorporation by cartilage. *J Lab Clin Med*, 49:825-836, 1957.
79. Schmidt MB, Chen EH, Lynch SE: A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair. *Osteoarthritis Cartilage*, 14:403-412, 2006
80. Sechriest VF, Miao YJ, Niyibizi C, Westerhausen-Larson HW, MatthewHW, Evans CH, Fu FH, Suh JK: GAG-augmented polysaccharide hydrogel: A novel biocompatible and biodegradable material to support chondrogenesis. *J Biomed Mater Res*, 49:534-541, 2000.
81. Sellers RS, Peluso D, Morris EA: The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on the healing of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg*, 79 A:1452-1463, 1997.
82. Sellers RS, Zhang R, Glasson SS, Kim HD, Peluso D, D'Augusta DA, Beckwith K, Morris EA: Repair of articular cartilage defects one year after treatment with recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Bone Joint Surg*, 82 A:151-60, 2000.
83. Senkoylu A, Sahin F, Simsek A, Ozogul C, Menevse S, Denkbaz E, Piskin E: Interaction of cultured chondrocyte with chitosan scaffold. *J Bioactive Comp Polym*, 16:136-144, 2001.
84. Shapiro F, Koide S, Glimcher M: Cell origin and differentiation in the repair of fill-

- thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg*, 75 A:532-553, 1993.
85. Shida J, Jingushi S, Izumi T, hvaki A, Sugioka Y: Basic fibroblast growth factor stimulates articular cartilage enlargement in young rats *invivo*. *J Orthop Res*, 14:265-272, 1996.
86. Solursh M: Formation of cartilage tissue *in vitro*. *J Cell Biochem*, 45:258-260, 1991.
87. Speer DP, Chvapil M, Volz RG, Holmes MD: Enhancement of healing in osteochondral defects by collagen sponge implants. *Clin Orthop Relat Res*, 144:326-335, 1979.
88. Sprugel KH, McPherson JM, Clowes AW: Effects of growth factors *in vivo*. *Am J Pathol*, 129:601-613, 1987.
89. Steinmeyer J, Knue S, Raiss RX, Pelzer I: Effects of intermittently applied cyclic loading on proteoglycan metabolism and swelling behaviour of articular cartilage explants. *Osteoarthritis Cartilage*, 7:155-164, 1999.
90. Temenoff JS, Mikos AG: Injectable biodegradable materials for orthopaedic tissue engineering. *Biomaterials*, 21:2504-2512, 2000.
91. Tew S, Redman S, Kwan A, Walker E, Khan I, Dowthwaite G, Thomson B, Archer CW: Differences in repair responses between immature and mature cartilage. *Clin Orthop Rel Res*, 391:142-152, 2001.
92. Trippel BS, Coutts DR, Einhorn AT, Mundy RG, Rosenfeld GR: Growth factors as therapeutic agents. *J Bone Joint Surg*, 78 A:1272-1286, 1996.
93. Tuncel M, Halici M, Canoz O, Yildirim Turk C, Oner M, Ozturk F, Kabak S: Role of insulin like growth factor-I in repair response in immature cartilage. *Knee*, 12:113-119, 2005.

94. Vacanti CA, Langer R, Schloo B, Vacanti JP: Synthetic polymer seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. *Plast Recons Surg*, 88:753-759, 1991
95. Vacanti CA, Kim W, Schloo B, Upton J, Vacanti JP: Joint resurfacing with cartilage grown in situ from cell-polymer structures. *Am J Sports Med*, 22:485-488, 1994.
96. Vacanti CA, Vacanti JP: The science of tissue engineering. *Orthop Clin North*, 31:351-356, 2000.
97. Vanden Berg WB, Vander Kraan PM, Schartstuhl A, Van Beuningen HM: Tissue engineering, cells, scaffolds and growth factors. *Clin Orthop Rel Res*, 391:244-250, 2001.
98. Van Susante JLC, Buma P, Van Osch GJVM, Versleyen D, Van Der Kraan PM, Van Der Berg WB, Homminga GN: Culture of chondrocytes in alginate and collagen carrier gels. *Acta Orthop Scand*, 66:549-556, 1995.
99. van Valburg AA, van Roermund PM, Marijnissen AC, van Melkebeek J, Lammens J, Verbout AJ, Lafeber FP, Bijlsma JW: Joint distraction in treatment of osteoarthritis: a two-year follow-up of the ankle. *Osteoarthritis Cartilage*, 7:474-479, 1999.
100. Wakitani S, Imoto K, Kimura T: HGF facilitates cartilage repair. Full-thickness articular cartilage defect studied in rabbit knees. *Acta Orthop Scand*, 68:474-480, 1997.
101. Weiss C: Normal and osteoarthritic articular cartilage. *Orthop Clin North Am*, 10:175-189, 1979.
102. Widenfalk B, Engkvist O, Ohlson L, Segeström K: Perichondrial arthroplasty using fibrin glue and early mobilization. *Scand J Plast Reconstr Surg*, 20:251-258,

- 1986.
103. Yaylaoglu MB, Yildiz C, Korkusuz F, Hasirci V: A novel osteochondral implant. *Biomaterials*, 20:1513-1520, 1999.
104. Yetkin H, Senkoylu A, Cila E, Ozturk AM, Simsek A: Biodegradable implants in orthopaedics and traumatology. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 30:297-301, 2000.
105. Yıldız C, Bahçe M, Şehirlioğlu A, Tunay S, Eler K, Başbozkurt M, Oğur G, Gür E; Enjektabl Kondrosit. *Acta Orthop Traumatol Turc*, 32:159-162, 1998.