



Trombositten zengin plazma kronik fokal kondral defektlerin mikrofraktür ile tedavisini daha etkin kılar mı? Sıçan modeli *in vivo* çalışma

Onur HAPA¹, Hüsamettin ÇAKICI², Halil Yalçın YÜKSEL³, Tülin FIRAT⁴, Aysel KÜKNER⁴, Hayati AYGÜN⁵

¹Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, İzmir;

²Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Bolu, Turkey;

³Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği, Ankara;

⁴Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Bolu;

⁵Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Kars

Amaç: Mevcut çalışmanın amacı trombositten zengin plazma (*platelet-rich plasma*, PRP) + mikrofraktür ile mikrofraktür tedavilerinin kronik fokal kondral defekt iyileşmesine etkisini karşılaştırmaktır.

Çalışma planı: Bu çalışmada 57 adet erişkin erkek Sprague-Dawley sıçanı kullanıldı. Kırk iki sıçan kondral defekt oluşturulduktan sonra 14'erlikten 3 gruba (kontrol, sadece mikrofraktür, PRP+mikrofraktür) ayrıldı. Kalan 15 sıçan PRP hazırlanmasında kullanıldı. Tedaviden 3 ve 6 hafta sonra sıçanlara ötenazi uygulandı ve incelemeleri yapıldı. Uyarlanmış Pineda skorlama sistemi ile histolojik analiz ve Tip 2 kollajen için immünohistokimyasal boyama yapıldı.

Bulgular: Her iki zaman aralığında da, kontrol grubu histolojik skorları (3. hafta: 8.8±1.2, 6. hafta: 8.5±0.7) mikrofraktür (3. hafta: 6.8±1.0, 6. hafta: 7.1±0.6) ve PRP+mikrofraktür (3. hafta: 6.4±1.3, 6. hafta: 5.7±1.2) gruplarından daha yüksekti (p<0.05). Altıncı hafta mikrofraktür grup skoru, 6. hafta PRP+mikrofraktür grubundan daha yüksekti (p<0.05). Tip 2 kollajen boyanma derecesi 6. haftada PRP+mikrofraktür grubunda daha yüksekti ve hücre membranında membranöz boyama gözlemlendiğinden benzersizdi.

Çıkarımlar: Kronik fokal kondral defekt tedavisi için mikrofraktürlerle birlikte PRP uygulamasının kırıldak iyileşmesini daha etkin kıldığı gözlemlenmektedir.

Anahtar sözcükler: Kırıldak onarımı; mikrofraktür; trombositten zengin plazma.

Göreceli olarak basit tek aşamalı bir işlem olması, yüksek etkinliği, düşük morbiditesi ve başarısız mikrofraktür tedavisi sonrasında olog kondrosit implantasyonu gibi ikinci basamak pahalı işlemlerin etkinliğinin gösterilmesi nedenleriyle mikrofraktürün dizdeki kırıldak defektlerinin birinci basamak tedavisi olduğu kabul

edilmektedir.^[1,2] Bununla birlikte, mikrofraktür tekniğindeki iyileşme dokusu olan 'fibrokırıldak' zaman içinde bozulmakta,^[3,4] bu da özellikle atletik toplulukta, kısa dönemdeki yüksek tatminin daha uzun süreli klinik izlemde neden anlamlı şekilde azaldığını muhtemelen açıklamaktadır.^[5-7]

Yazışma adresi: Dr. Onur Hapa, Çelikkent Sitesi A-2 No: 6, Çayyolu, Ankara.

Tel: 0505 - 776 94 31 e-posta: onurhapa@gmail.com

Başvuru tarihi: 28.05.2012 **Kabul tarihi:** 14.11.2012

©2013 Türk Ortopedi ve Travmatoloji Derneği

Bu yazının çevrimiçi İngilizce versiyonu
www.aott.org.tr adresinde
doi:10.3944/AOTT.2013.2928
Karekod (Quick Response Code):



Trombositten zengin plazma (*platelet-rich plasma*, PRP) otolog büyüme faktörlerinin zengin bir kaynağıdır, trombosit konsantrasyonu tam kan başlangıç değerinin üzerindedir ve içeriğinde trombositten türetilmiş büyüme faktörü (PDGF), dönüştürücü büyüme faktörü (TGF- β), fibroblastik büyüme faktörü (FGF), insülin-benzeri büyüme faktörü (IGF), damarsal endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve epitelyal hücre büyüme faktörü (EGF) bulunmaktadır.^[8] Bu büyüme faktörleri trombosit aktifleşmesi üzerine α -granüllerden salgılanır ve iyileşmeyi hızlandırmak için yaralanma bölgesine aktarılır.^[9-11]

Otojen olarak kullanılan PRP bulaştırılabilir hastalık riski taşımaz ve çoğu büyüme faktörünün uygulanmasının basit, düşük maliyetli, minimal invaziv bir yöntemidir. Ortopedi ve spor hekimliği dahil tıbbın çeşitli alanlarında kullanılmaya başlanmıştır.^[12] Kırık iyileşmesi, kaynamama tedavisi, Aşil tendonu onarımları, çeşitli kronik tendinit sorunlarının tedavisi, kırık iyileşmesi ve rotator manşet onarımlarına dair çeşitli klinik ve hayvan çalışmalarında farklı sonuçlar aktarılmaktadır.^[11-16] En güncel olarak *in vivo* bir hayvan çalışmasında, fokal osteokondral defekt iyileşmesinde lokal taşıyıcıyla birlikte yerel PRP uygulamasının yararları bildirilmiştir.^[16]

Mevcut çalışmanın amacı sıçan modelindeki kronik fokal kondral defektin iyileşmesinde mikrofraktürle birlikte PRP enjeksiyonunun etkisini değerlendirmektir. Çalışmadaki hipotezimiz mikrofraktürle birlikte uygulanan PRP'nin sadece mikrofraktür tedavisine kıyasla kırık onarımında daha etkili olacağı ve hiyalin kırık ve kondrojenik ayrışmaya özel Tip 2 kollajen ekspresyonunda da artışa yol açacağı yönündedir.^[2]

Gereç ve yöntem

Çalışmada ortalama vücut ağırlığı 324 (dağılım: 300-360) g olan 57 erişkin erkek Sprague-Dawley sıçanı kullanıldı. Çalışma enstitü hayvan kurulu ve etik komitesi tarafından onaylanmıştı. Kafes başına 3 adet olacak şekilde, sıçanlar 21°C'de 12-saatlik aydınlık ve karanlık döngüsünde tutuldu ve istendiği kadar gıda ve su verildi. Çalışmaya alınan 42 sıçana sol diz cerrahisi uygulandı. Kalan 15 sıçan kan alımı ve PRP üretimi için kullanıldı.

Sıçanlar 14'erlikten 3 gruba ayrıldı (PRP+mikrofraktür, sadece mikrofraktür, ve kontrol grubu). Keta-min ve ksilazin anestezisi altında sıçanların sol dizleri tıraş edildi ve antiseptik çözeltiyle temizlendi. Dizler fleksiyondayken medial parapatellar insizyondan artrotomi yapıldı. 3x3 mm'lik bir alan femur kondilinin ağırlığa karşı gelen bölgesinde bir kalem ile işaretlendi. Takiben, No. 11 bistüri ile tam kalınlıkta defekt oluşturulup, subkondral kemik açığa çıkarılana kadar kırıkta

oblik bir kesi yapıldı.^[17] Kapsül emilebilir dikişle onarıldı ve cilt emilemez dikişlerle kapatıldı. Cerrahi sonrası immobilizasyon uygulanmadı ve sıçanların serbest hareket etmesine izin verildi.

Cerrahi sonrası birinci ayda artrotomi önceki insizyondan tekrarlanarak defekt alanına ulaşıldı. Mikrofraktür grubunda, K-teli kullanılarak 1.5 mm genişlik ve 2 mm derinlikte bir delik açıldı. PRP+mikrofraktür grubunda, ek olarak 300 μ l PRP (150 μ l mikrofraktürden sonra, 150 μ l tabakalar kapatıldıktan sonra) mikrofraktür deliğine uygulandı. Kontrol grubu ile sadece mikrofraktür gruplarında, 300 μ l miktarında serum fizyolojik enjekte edildi. Tabakalar anatomik şekilde kapatılarak yine cerrahi sonrası immobilizasyon uygulanmadı.

Bu üç grup daha sonra her birinde 7 sıçan bulunan 2 alt gruba ayrıldı. Üçüncü haftada her üç tedavi ve kontrol gruplarının bir alt grubuna ötenazi uygulanarak sıçanlar histolojik analize gönderildi. Geri kalan hayvanlar aynı işlemler uygulanmak üzere 6. haftada sakrifiye edildi.

Histolojik analiz çalışma gruplarına körlenene araştırmacı (A.K., Histoloji ve Embriyoloji Uzmanı) tarafından yapıldı. Dokular %10 formalin ile sabitlendi ve EDTA içinde dekalsifiye edildi. Dekalsifiye doku parafine yatırılarak, takiben, femur kondilinin defekt bölgesindeki çekirdek alanından her biri 5 μ m kalınlığında boyamsal seri kesitler alındı. Hematoksilen ve eozin (H&E) ve toluidin mavisi ile boyama yapıldı. İmmünohistokimyasal değerlendirme için, kesitler poli-L-lisin-kaplı cam slaytlara yerleştirildi ve endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için %0.3'lük H₂O₂'ye daldırıldı. Kesitler, daha sonra, Tip 2 kollajene (Santa Cruz Biotechnology

Tablo 1. Histolojik analiz için uyarlanmış Pineda skorlama sistemi.^[18]

Yüzde olarak defektin dolması	Puan
125	1
100	0
75	1
50	2
25	3
Osteokondral birleşkenin tekrardan yapılandırılması	Puan
Evet	0
Neredeyse	1
Uzak	2
Hücre morfolojisi	Puan
Normal	0
Çoğunlukla hiyalin ve fibrokırık	1
Çoğunlukla fibrokırık	2
Biraz fibrokırık ancak çoğunlukla kondrositik olmayan hücreler	3
Sadece kondrositik olmayan hücreler	4

Inc., Heidelberg, Almanya) karşı yönlendirilmiş fare monoklonal antikoru ile kuluçkaya yatırıldı.

Defekt alanındaki iyileşme hücresel morfoloji, osteokondral birleşkenin tekrardan yapılanması ve defektin dolma yüzdesi bakımından değerlendirildi. Bu birleşkenler uyarlanmış Pineda skorlama sistemi kullanılarak değerlendirilerek skorlandı (Tablo 1).^[18]

Trombositten zengin plazmanın hazırlanması için 15 erkek Sprague-Dawley sıçandan tam kan alındı. Deney hayvanlarının anestezisi periton içine ketamin (80 mg/kg) ve ksilazin (5 mg/kg) enjeksiyonu ile yapıldı. Her sıçanın büyük damarlarından yaklaşık 5 ml tam kan alındı. Daha sonra, pentobarbital doz aşımı kalp içine enjekte edilerek sıçanlar sakrifiye edildi. Takiben, antikoagülanlı kan 20 dakika süre ile 220 G'de santrifüjlendi. Sıçan trombositlerinden pelet oluşturulması için süpernatant 20 dakika süre ile tekrardan 480 G'de santrifüjlendi. İlk örnekteki trombosit sayısı sayılmış ve 13.8×10^9 trombosit/L olduğu bulunmuştur.^[19]

Grupların histolojik skorlarının iki farklı zaman diliminde (3. hafta ve 6. hafta) karşılaştırılması için Mann-Whitney U testinden yararlanıldı. $P < 0.05$ olan farklılık-

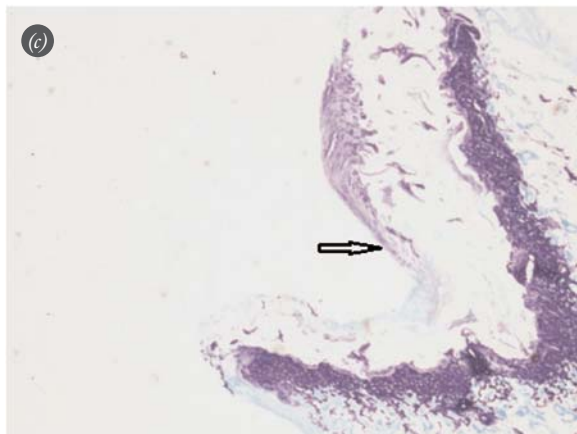
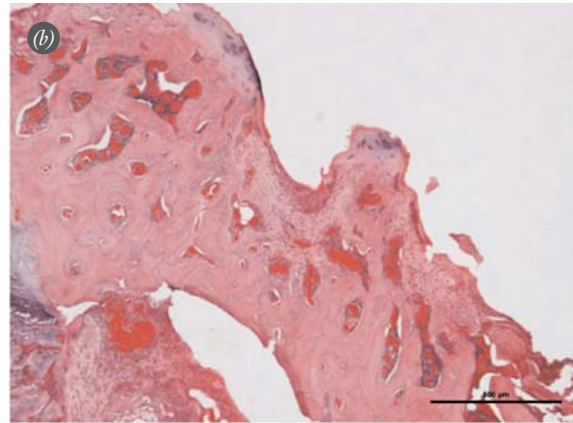
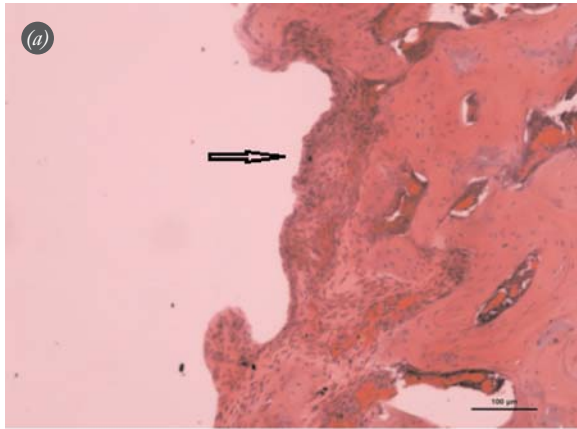
lar anlamlı kabul edildi. Veriler ortalama \pm SS olarak sunulmuştur.

Bulgular

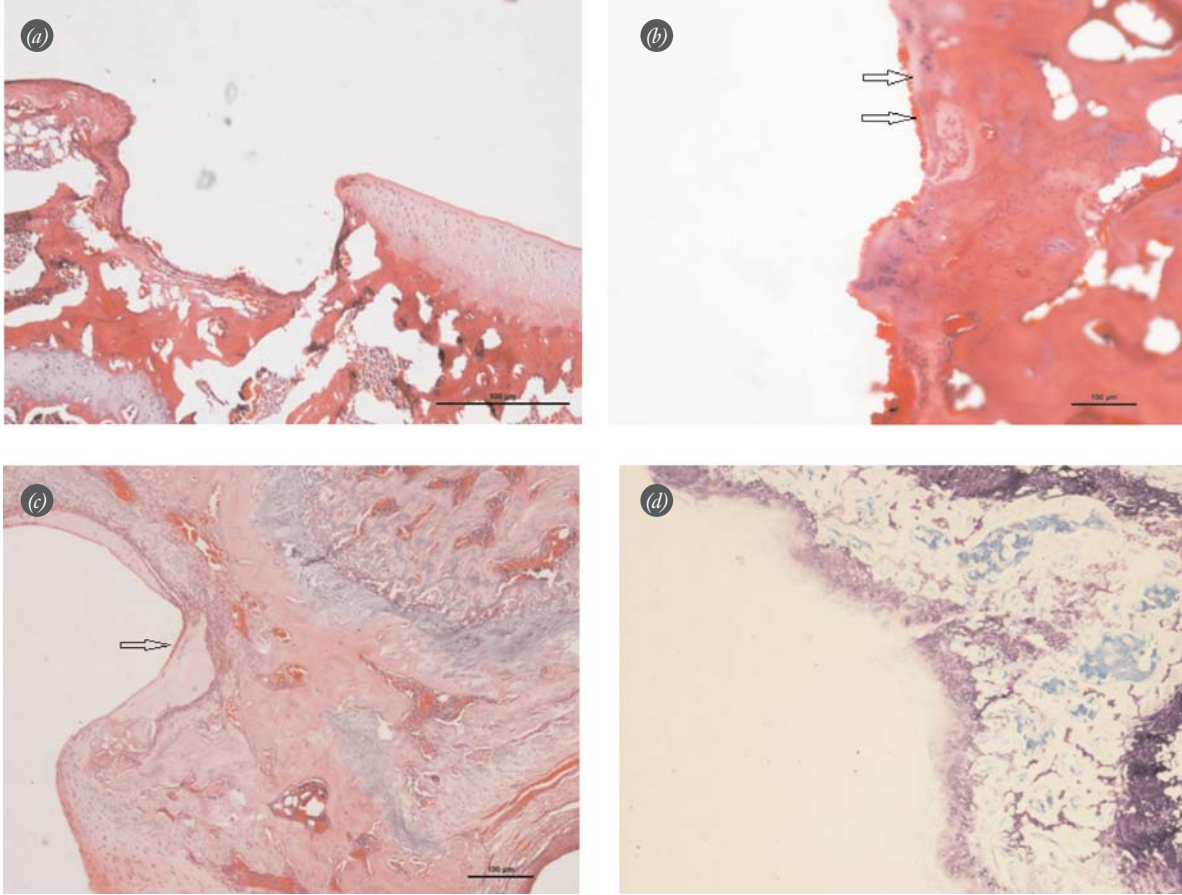
Cerrahi sonrası herhangi bir komplikasyon gelişmedi. Her örnekte defekt alanı kolaylıkla saptanmış ve makroskopik ve mikroskopik olarak değerlendirilmiştir.

Üçüncü hafta kontrol grubunda defekt alanında yoğun bir bağ dokusu yanıtı görüldü (Şekil 1a). Bağ dokusu yanıtı hafta 3 mikrofraktür grubunda daha azdı ve defekt alanında kıkırdak hücresi yoktu (Şekil 1b). Üçüncü hafta PRP+mikrofraktür grubunda, kıkırdak hücrelerinin sağlam kıkırdak kenarından defekt alanına doğru ilerlediği gözlemlendi (Şekil 1c). Tüm 3. hafta gruplarında damarlarda belirgin kan konjesyonu mevcuttu.

Altıncı hafta kontrol grubunda, bağ dokusu yanıtı derecesi 3. hafta kontrol grubuna kıyasla daha az olduğu halde, defekt iyileşmesi 3. hafta kontrol grubu ile benzerdi (Şekil 2a). Altıncı hafta mikrofraktür grubunda, defekt alanında az sayıda kıkırdak hücresi saptandı (Şekil 2b). Altıncı hafta PRP+mikrofraktür grubunda, defekt alanında kıkırdak hücresi içeren eozinofilik bo-



Şekil 1. (a) Üçüncü hafta kontrol grubundan görüntü. Defekt alanında yoğun bağ dokusu yanıtı (ok) (H-E x10). (b) Üçüncü hafta mikrofraktür grubundan görüntü. Bağ dokusu yanıtı daha düşük derecede (H-E x10). (c) 3. hafta PRP+mikrofraktür grubundan görüntü. Kondrositlerin defekt alanına ilerlemesi (ok) (toluidin mavisi x10). [Bu şekil, derginin www.aott.org.tr adresindeki çevrimiçi versiyonunda renkli görülebilir]



Şekil 2. (a) Altıncı hafta kontrol grubundan görüntü (H-E x10). (b) Altıncı hafta mikrofraktür grubundan görüntü. Defekt alanında ince tabaka halinde kondrositler (ok) (H-E x10). (c) Altıncı hafta PRP+mikrofraktür grubundan görüntü. Kıkırdak hücrelerinin eozinofilik boyanmış ince tabakası (ok) (H-E x10). (d) Altıncı hafta PRP+mikrofraktür grubundan görüntü. Bir kondrosit tabakası ile defektin tamamen kapanması (H-E x10). [Bu şekil, derginin www.aott.org.tr adresindeki çevrimiçi versiyonunda renkli görülebilir]

yanmış ince tabaka gözlemlendi (Şekil 2c). Bir örnekte, kıkırdak hücrelerinden oluşan ince bir tabaka ile defekt alanının tamamen kapandığı görüldü (Şekil 2d).

Üçüncü ve 6. hafta kontrol gruplarında defekt alanındaki az sayıda hücrede Tip 2 kollajen boyama gözlemlendi (Şekil 3a). Benzer biçim ve boyanma miktarı 3. ve 6. hafta mikrofraktür gruplarında da gözlenmekteydi (Şekil 3b). Üçüncü hafta PRP+mikrofraktür grubunda boyanma eğiliminde kaydedilen artış (Şekil 3c), 6. hafta PRP+mikrofraktür grubunda belirgin hale gelmişti. Yine bu grupta hücre membranındaki boyanmayla birlikte Tip 2 kollajen ile boyanmış hücre sayısında artış görüldü (Şekil 3d). Bu grup hücre içi boyanma biçimi gösteren diğer gruplardan farklılık göstermekteydi.

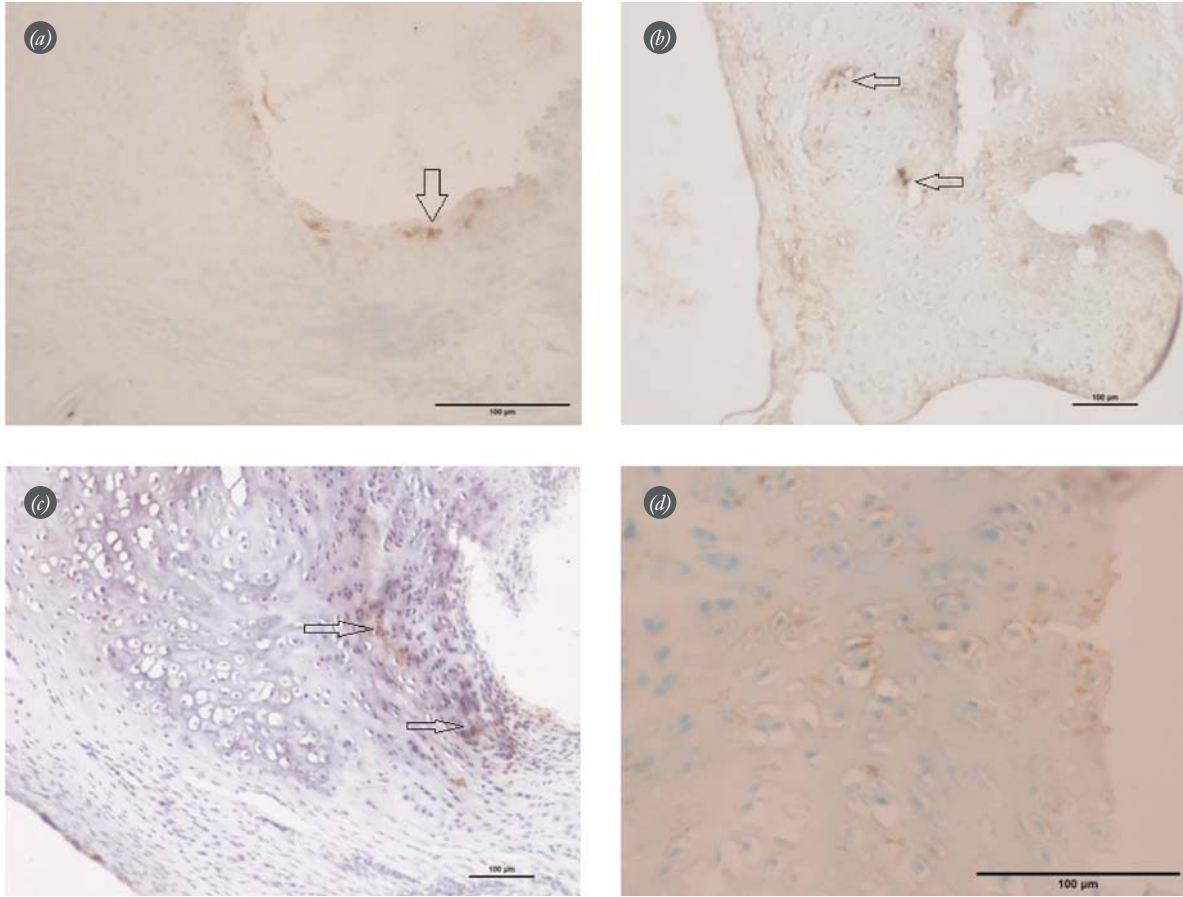
Her iki zaman diliminde de kontrol grubu histolojik skorları (3. hafta: 8.8 ± 1.2 , 6. hafta: 8.5 ± 0.7), mikrofraktür (3. hafta: 6.8 ± 1.0 , $p=0.01$; 6. hafta: 7.1 ± 0.6 , $p=0.01$) ve PRP+mikrofraktür (3. hafta: 6.4 ± 1.3 , $p=0.01$; 6. hafta: 5.7 ± 1.2 , $p=0.002$) gruplarından daha yüksekti ($p<0.05$). Altıncı hafta mikrofraktür grubunun skorunun

6. hafta PRP+mikrofraktür grubundan daha yüksek olduğu görüldü ($p=0.03$).

Tartışma

Çalışma sayılarının göreceli azlığı, izlem süresinin kısıtlılığı ve sonuç ölçütlerinin heterojenliği artiküler kıkırdak defektlerinin onarımında bir tekniğin diğerine tercih edilmesini zorlaştırmaktadır. Mikrofraktür tedavisi pek az cerrahi öncesi planlama gerektirir ve otolog kondrosit implantasyonu veya osteokondral otogreft nakli gibi diğer pahalı karmaşık işlem seçeneklerini ekarte etmez. Defekt alanında oluşan fibrokıkırdak çoğunlukla mikrofraktür klinik sonuca dair gelişen memnuniyetsizliğin başlıca nedenidir.^[5-7] Yukarıda söz edilen güncel kıkırdak tedavisi modelleri defekt alanında hiyalen kıkırdakı tekrardan oluşturmayı veya tekrardan yerleştirmeyi amaçlar.

Trombositten zengin plazmanın yararlı etkileri ortopedi literatüründe hem *in vivo* hem de klinik çalışmalarla kanıtlanmış, çeşitli tendinit sorunlarının, kırık kay-



Şekil 3. (a) Kontrol grubundan görüntü. Tip 2 kollajen (ok) için immünohistokimyasal boyama (H-E x10). (b) Mikrofraktür grubundan görüntü. Tip 2 kollajen (ok) için immünohistokimyasal boyama (H-E x10). (c) Üçüncü hafta PRP+mikrofraktür grubundan görüntü. Tip 2 kollajen (ok) için immünohistokimyasal boyama (H-E x10). (d) Altıncı hafta PRP+mikrofraktür grubundan görüntü. Tip 2 kollajen için immünohistokimyasal boyama. [Bu şekil, derginin www.aott.org.tr adresindeki çevrimiçi versiyonunda renkli görülebilir]

namamasının ve rotator manşet yırtıklarının tedavisinde olumlu sonuçları bildirilmiştir.^[11-16] Literatürde koyun modelinde kronik kondral defekt tedavisinde mikrofraktürle birlikte PRP'nin etkinliğini gösteren az sayıda *in vivo* çalışma vardır. Bu çalışmalarda, PRP jel veya PRP sıvı enjeksiyonunun histolojik skorları sadece mikrofraktür grubundan daha yüksektir.^[20-22] Bununla birlikte, mevcut çalışmadan farklı olarak, bu çalışmalarda bir kontrol grubu yoktur ve hiyalen kondrojenik ayrışmanın saptanmasında Tip 2 kollajen immünohistokimyasal boyanma uygulanmamıştır.^[21-23] Oysa, bu uygulama diğer *in vivo* kıkırdak çalışmalarında rutin olarak gerçekleştirilmektedir.^[18,23]

Defekt alanında kıkırdak hücre membranında PRP+mikrofraktür sonrası 6. haftada Tip 2 kollajen ekspresyonunda artış, hücresel aktivite artışı, hücre dışı madde sentezi ve göç artışı, subkondral progenitör hücrelerin uyarılması ile açıklanabilir. Bu son durum en güncel olarak insan subkondral progenitör hücrelerinde yapılan bir *in vitro* çalışmada bildirilmiştir.^[24]

Çalışmamızın bazı kısıtlılıkları mevcuttur. Mevcut hayvan modeli klinik olarak görülen kronik fokal kondral defektleri tam olarak karşılamamaktadır. Literatürdeki sıçan kronik fokal kondral defekt modellerinde belirtildiği gibi, büyüme faktörlerinin veya ilk yaralanmadan kaynaklanan sitokinlerin ilk yaralanmadan 1 ay sonra devam eden bir etkisi yoktur ve kemik iliğinden tetiklenen pluripotent hücreler kemik iliği ve PRP'den tetiklenen büyüme faktörleriyle etkileşime girmektedir.^[18,25] Defekt alanındaki Tip 2 kollajen ile boyanmış kıkırdak hücrelerinin mevcut çalışmada PRP+mikrofraktür gruplarında kontrol gruplarına göre daha yüksek derecede gözlenmesi bu bulguyu desteklemektedir.

İkinci bir olası kısıtlılık hangi PRP birleşenlerinin saptadığımız iyileşmelerden sorumlu olduğunu tanımlamamız veya onarım bölgesinde PRP aktivitesinin biyoyararlanım ya da süresine yönelik bilgi sağlamamızdır. Bu, mikrofraktürsüz sadece PRP ile tedavi edilmiş diğer bir grubun eklenmesiyle mümkün olabilirdi.

Çalışmamızdaki izlem süresi de göreceli olarak kısadır. Bununla birlikte, sıçanların iyileşme potansiyeli mevcut çalışmada gruplar arasında farklılık bildirecek kadar hızlı idi. Ayrıca, literatürde de önerilen izlem süreleri 40 gün ila 72 hafta arasında değişmektedir.^[17,18,23,26,27] Boyutu doğru ve tekrarlanabilir olan tam kalınlıkta artiküler kırıkta defektlerinin sıçan modeli halen araştırılmakta^[28] ve bildirilen çoğu teknikte osteokondral defekt oluşturmak için bistüri veya matkap ucu kullanılmaktadır.^[17,18,26,27] Bununla birlikte, kırıkta iyileşmesinin değerlendirilmesi açısından daha uygun olabilecek standart boyutta yuvarlak biçimli defektler oluşturulmasında biyopsi delgisi daha uygun olabilir.^[29]

Mevcut çalışmada daha güncel popüler sistemler olan, çoğunlukla koyun veya tavşan gibi daha büyük hayvan modellerinde kullanılan O'Driscoll skorlaması ve Uluslararası Kırıkta Onarım Topluluğu (*International Cartilage Repair Society*, ICRS) skorlamaları^[22,30] yerine, sıçan modellerinde kullanılan Pineda histolojik skorlamasını tercih ettik.^[18,23] İmmünohistokimyasal boyamanın nicel skorlaması veya iyileşmiş kırıkta biyomekanik değerlendirmesi ayrıca yapılabilir ve bunlar hipotezin kanıtlanmasına katkıda bulunabilirdi. Bununla birlikte, literatürde nicel skorlama sisteminin veya biyomekanik testlerin uyarlanabileceği herhangi bir sıçan modeli çalışması saptayamadık.^[18,22,23,27,28]

Sonuç olarak, çalışmamız sıçan kronik fokal kondral defekt modelinde mikrofraktürle birlikte PRP uygulaması sadece mikrofraktür uygulamasına kıyasla daha iyi kırıkta iyileşmesi ve Tip 2 kollajen ekspresyonunda artışla sonuçlandığını ortaya koymaktadır. Daha gelişkin kırıkta iyileşme mekanizmalarının değerlendirilmesi için gelecek çalışmalara ihtiyaç vardır.

Teşekkür

Mevcut çalışma bir TOTBİD (Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği) bursuyla desteklenmiştir.

Çıkar Örtüşmesi: Çıkar örtüşmesi bulunmadığı belirtilmiştir.

Kaynaklar

- Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen TC, Drogset JO, Grøntvedt T, Solheim E, et al. Autologous chondrocyte implantation versus microfracture in the knee. A randomized trial. *J Bone Joint Surg Am* 2004;86-A:455-64.
- Zaslav K, Cole B, Brewster R, DeBerardino T, Farr J, Fowler P, et al. A prospective study of autologous chondrocyte implantation in patients with failed prior treatment for articular cartilage defect of the knee: results of the Study of the Treatment of Articular Repair (STAR) clinical trial. *Am J Sports Med* 2009;37:42-55.
- Mithoefer K, Williams RJ 3rd, Warren RF, Potter HG, Spock CR, Jones EC, et al. The microfracture technique for the treatment of articular cartilage lesions in the knee. A prospective cohort study. *J Bone Joint Surg Am* 2005;87:1911-20.
- Nehrer S, Spector M, Minas T. Histologic analysis of tissue after failed cartilage repair procedures. *Clin Orthop Relat Res* 1999;(365):149-62.
- Gobbi A, Nunag P, Malinowski K. Treatment of full thickness chondral lesions of the knee with microfracture in a group of athletes. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2005;13:213-21.
- Kreuz PC, Erggelet C, Steinwachs MR, Krause SJ, Lahm A, Niemeier P, et al. Is microfracture of chondral defects in the knee associated with different results in patients aged 40 years or younger? *Arthroscopy* 2006;22:1180-6.
- Kreuz PC, Steinwachs MR, Erggelet C, Krause SJ, Konrad G, Uhl M, et al. Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;14:1119-25.
- Lopez-Vidriero E, Goulding KA, Simon DA, Sanchez M, Johnson DH. The use of platelet-rich plasma in arthroscopy and sports medicine: optimizing the healing environment. *Arthroscopy* 2010;26:269-78.
- Anitua E, Andía I, Sanchez M, Azofra J, del Mar Zalduendo M, de la Fuente M, et al. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Orthop Res* 2005;23:281-6.
- De Mos M, van der Windt AE, Jahr H, van Schie HT, Weinans H, Verhaar JA, et al. Can platelet-rich plasma enhance tendon repair? A cell culture study. *Am J Sports Med* 2008;36:1171-8.
- Mishra A, Pavelko T. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. *Am J Sports Med* 2006;34:1774-8.
- Kon E, Filardo G, Delcogliano M, Presti ML, Russo A, Bondi A, et al. Platelet-rich plasma: new clinical application: a pilot study for treatment of jumper's knee. *Injury* 2009;40:598-603.
- Barber FA, Hrnack SA, Snyder SJ, Hapa O. Rotator cuff repair healing influenced by platelet-rich plasma construct augmentation. *Arthroscopy* 2011;27:1029-35.
- Sánchez M, Anitua E, Azofra J, Andía I, Padilla S, Mujika I. Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *Am J Sports Med* 2007;35:245-51.
- Sanchez M, Anitua E, Cugat R, Azofra J, Guadilla J, Seijas R, et al. Nonunions treated with autologous preparation rich in growth factors. *J Orthop Trauma* 2009;23:52-9.
- Sun Y, Feng Y, Zhang CQ, Chen SB, Cheng XG. The regenerative effect of platelet-rich plasma on healing in large osteochondral defects. *Int Orthop* 2010;34:589-97.
- Tetik O, Doral MN, Atay AO, Leblebicioğlu G. Influence of irrigation solutions combined with colchicine and diclofenac sodium on articular cartilage in a rat model. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2004;12:503-9.
- Nishimori M, Deie M, Kanaya A, Exham H, Adachi N, Ochi M. Repair of chronic osteochondral defects in the rat. A bone marrow-stimulating procedure enhanced by cultured allogenic bone marrow mesenchymal stromal cells. *J Bone Joint Surg Br* 2006;88:1236-44.
- Virchenko O, Grenegård M, Aspenberg P. Independent and additive stimulation of tendon repair by thrombin and platelets. *Acta Orthop* 2006;77:960-6.
- Milano G, Sanna Passino E, Deriu L, Careddu G, Manunta L, Manunta A, et al. The effect of platelet rich plasma combined with microfractures on the treatment of chondral defects: an

- experimental study in a sheep model. *Osteoarthritis Cartilage* 2010;18:971-80.
21. Milano G, Deriu L, Sanna Passino E, Masala G, Saccomanno MF, Postacchini R, et al. The effect of autologous conditioned plasma on the treatment of focal chondral defects of the knee. An experimental study. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2011;24:117-24.
 22. Milano G, Deriu L, Sanna Passino E, Masala G, Manunta A, Postacchini R, et al. Repeated platelet concentrate injections enhance reparative response of microfractures in the treatment of chondral defects of the knee: an experimental study in an animal model. *Arthroscopy* 2012;28:688-701.
 23. Miyamoto A, Deie M, Yamasaki T, Nakamae A, Shinomiya R, Adachi N, et al. The role of the synovium in repairing cartilage defects. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2007;15:1083-93.
 24. Krüger JP, Hondke S, Endres M, Pruß A, Siclari A, Kaps C. Human platelet-rich plasma stimulates migration and chondrogenic differentiation of human subchondral progenitor cells. *J Orthop Res* 2012;30:845-52.
 25. Bos PK, van Osch GJ, Frenz DA, Verhaar JA, Verwoerd-Verhoef HL. Growth factor expression in cartilage wound healing: temporal and spatial immunolocalization in a rabbit articular cartilage wound model. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9:382-9.
 26. Dausse Y, Grossin L, Miralles G, Pelletier S, Mainard D, Hubert P, et al. Cartilage repair using new polysaccharidic biomaterials: macroscopic, histological and biochemical approaches in a rat model of cartilage defect. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11:16-28.
 27. Harada Y, Tomita N, Nakajima M, Ikeuchi K, Wakitani S. Effect of low loading and joint immobilization for spontaneous repair of osteochondral defect in the knees of weightless (tail suspension) rats. *J Orthop Sci* 2005;10:508-14.
 28. Anraku Y, Mizuta H, Sei A, Kudo S, Nakamura E, Senba K, et al. The chondrogenic repair response of undifferentiated mesenchymal cells in rat full-thickness articular cartilage defects. *Osteoarthritis Cartilage* 2008;16:961-4.
 29. Kuroda R, Usas A, Kubo S, Corsi K, Peng H, Rose T, et al. Cartilage repair using bone morphogenetic protein 4 and muscle-derived stem cells. *Arthritis Rheum* 2006;54:433-42.
 30. Strauss E, Schachter A, Frenkel S, Rosen J. The efficacy of intra-articular hyaluronan injection after the microfracture technique for the treatment of articular cartilage lesions. *Am J Sports Med* 2009;37:720-6.