

Osteokondral Doku Mühendisliği

Osteochondral Tissue Engineering

Soner ÇAKMAK * 

Özet

Ortopedik cerrahide, osteokondral hasarların tedavisi hala tam olarak gerçekleştirilememektedir. Osteokondral hasarlar, aynı anda hem eklem kıkırdak ı hem de subkondral kemikte hasarın görüldü ğü durumları ifade etmektedir. Bu hasarların tedavisi için kıkırdak, kemik ve kıkırdak-kemik ara yüzeyinin fiziksel ve kimyasal özelliklerini göz önünde bulunduracak yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Osteokondral hasarların tedavisi için birçok cerrahi yöntemi geliştirilmiş olsa da bu yöntemler geçici bir iyileşme sağlar. Bu nedenle tedavi edici alternatif yöntemler üzerinde yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Bu noktada, osteokondral doku mühendisliği, biyomalzeme, hücreler ve çeşitli biyoaktif moleküllerin kullanımıyla, osteokondral hasarların tedavisi için ön plana çıkmaktadır. Bu derlemede, osteokondral doku mühendisliğinin temelleri, osteokondral dokunun yapısı, osteokondral hasarların tedavisinde kullanılan cerrahi yöntemler, bu alanda kullanılan biyomalzemeler ve tek/çok fazlı doku iskelesi tasarımları ve kullanımları, kullanılan büyüme faktörleri ve hücreler örnekleriyle anlatılmış, str.

Anahtar Kelimeler: Osteokondral doku mühendisliği, çok fazlı doku iskelesi, büyüme faktörü, kondrosit, kök hücre

Abstract Treatment of osteochondral defects can not be completely achieved in orthopaedic surgery. Osteochondral defects reflect damage to both the articular cartilage as well as the underside subchondral bone. The treatment strategies should take into consideration the physical and chemical properties of cartilage, bone and cartilage-bone interface. Although there are several surgical methods developed for the treatment of osteochondral defects, both of them have ensured temporary healing. Therefore, there have been intense efforts on alternative strategies for osteochondral regeneration. At this point, osteochondral tissue engineering have come to the forefront by using the combinations of biomaterials, cells and several bioactive molecules. In this review, fundamentals of osteochondral tissue engineering, osteochondral tissue structure and surgical treatment methods, the biomaterials used and design of single/multiphasic scaffolds, growth factors and cells are comprehensively presented with the current literature examples.

Keywords: Osteochondral tissue engineering, multiphasic scaffold, growth factor, chondrocyte, stem cell

¹ Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, ANKARA, TÜRKİYE

*Sorumlu Yazar:sonercakmak@gmail.com

* Bu makale yazarın Doktora Tezi'nden derlenmiştir.

Manuscript received date: February 21, 2018

Accept Date: May 8, 2018

Published Date: June 01, 2018.

Giriş

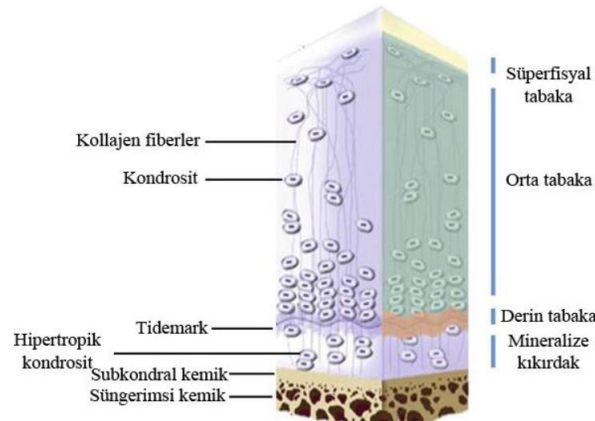
Yaşlanan popülasyonla birlikte kıkırdak dokuda görülen aşınma, osteokondral hasarların ana kaynağı olarak bilinen osteoartrit adlı hastalığa neden olmaktadır. 2008 yılındaki verilere bakılacak olursa, Avrupa Birliği sınırlarında 39 milyon kişi ve 20 milyondan fazla Amerikalı bu hastalıkla ilişkili büyük sıkıntılar yaşamakta ve 2020 yılına kadar hasta sayısının ikiye katlanacağı öngörülmektedir [1]. Osteokondral hasarlar, kemik, kıkırdak ve kemik-kıkırdak ara yüzeyinde görülen bir rahatsızlık veya dejenerasyon olarak tanımlanmakta ve insan vücudundaki herhangi bir eklem bölgesinde görülebilmektedir. Bu tarz bir hasardaki iyileşme, ancak bu farklı bölgelerdeki bileşenler göz önüne alınarak gerçekleştirilebilir. Osteokondral hasarların tamiri veya tedavisi, kemik, kıkırdak ve kemik-kıkırdak ara yüzey rejenerasyonunun aynı anda ve bir bütünlük içerisinde gerçekleşmesiyle mümkün

olmaktadır. Kemik doku ve kıkırdak doku mühendisliği uzun yıllardır üzerinde çalışılan araştırma alanlarındandır. Kemik ve kıkırdak biyolojisi, genel yapısı ve mekanik özelliklerinin daha iyi anlaşılmasıyla, bu iki ayrı bölgenin aynı anda tedavi edilebilmesi için kullanılan mevcut doku mühendisliği malzemelerine göre daha gelişmiş yapılara ihtiyaç duyulmaktadır.

Osteokondral Dokunun Yapısı Ve Özellikleri

Osteokondral dokunun en üst katmanını kıkırdak tabakası oluşturmaktadır. Kıkırdak, insan vücudunun çeşitli bölgelerinde bulunan esnek ve destek görevi gören bir dokudur. En önemli üç kıkırdak yapısı, fibröz kıkırdak, elastik kıkırdak ve hyalin kıkırdak olarak sıralanabilir. Hyalin kıkırdak, insan vücudunda en çok bulunan ve özellikle eklem bölgelerini oluşturan kıkırdak yapısıdır. Kıkırdak temel olarak su, kollajen, proteoglikanlar, kondrositler ve diğer proteinlerden oluşmaktadır. Her bir bileşenin, kıkırdağın destek işlevinin korunmasında önemli bir rolü bulunur. Kıkırdak hücre dışı matrisinde (ECM) bulunan proteoglikanlara bağlı glikozaminoglikanlar (GAG), yüksek yoğunlukta negatif yüke sahiptir. Bu negatif yükler, su içerisindeki aktif katyonları kendisine çeker. Fazla su daha sonra turgora neden olarak ECM'nin yüksek sıkıştırıcı kuvvetlere karşı koyabilmesini sağlar [2]. Eklem kıkırdaklarındaki ana GAG'lar kondroitin ve keratin sülfatlar iken ana proteoglikan ise agregan'dır. GAG ve proteoglikanlar bir polimer ağ tabaka oluşturarak yapısal kollajenlerle iç içe geçer [3]. Kollajen fiberlerin varlığı, eklem kıkırdağına yapısal ve elastik dayanım sağlar. Eklem kıkırdağında genellikle tip II kollajen bulunur fakat tip V, VI, IX ve XI kollajen de bu kıkırdak yapısında bulunmakta ve bu kollajenlerin moleküller arası etkileşimlerde ve tip II kollajen'in yapısal düzenlenmesinde önemli rol oynadıkları düşünülmektedir [4]. Bunlara ek olarak, bu kıkırdak yapısında bulunan tip X kollajenin kıkırdak ve alt kısmındaki kemik arasındaki mineralizasyona yardım ettiği düşünülmektedir [5].

Osteokondral bölgenin içeriğine bakılacak olursa bu yapının farklı katmanlardan oluştuğu görülür-bunlar; süperfisyel tabaka, orta ve derin tabakadır (Şekil 1). Süperfisyel tabaka eklem yüzeyinde yerleşmişken, derin tabaka mineralize kıkırdak tabakasına bağlanır (subkondral kemik) ve orta tabaka da bu ikisinin arasında kalan bölge olarak tanımlanabilir. Kıkırdağı oluşturan her bir tabaka, hücreler ve ECM bileşenleri açısından kendine özgü karakteristik ve organizasyonel bir yapılanmaya sahiptir. Süperfisyel tabaka, yassılaştırmış kondrositlerin varlığı ve ince kollajen fibrillerin eklem yüzeyine göre paralel bir şekilde düzenlenmesiyle karakterize edilir. Hücre yoğunluğu bu tabakada en fazladır [6]. Orta tabakada, kondrositler küresel şekilde ve kollajen fibriller süperfisyel tabakadakilere göre daha kalın ve daha az düzenli bir şekilde organize olmuştur. Derin tabakada ise kondrositler ve fiberler eklem yüzeyine dik olacak şekilde düzenlenmiştir ve kondrositler dikey bir kolon görüntüsü verir. Bu tabakada, kollajen fibrillerinin kalınlığı maksimum fakat, kollajen içeriği minimum değerdedir. Tüm tabakalar göz önünde bulundurulduğunda, agregan derişimi doku derinliklerine inildikçe, yani kemik bölgesine yaklaştıkça artış gösterir.



Şekil 1. Osteokondral dokunun yapısı [7]

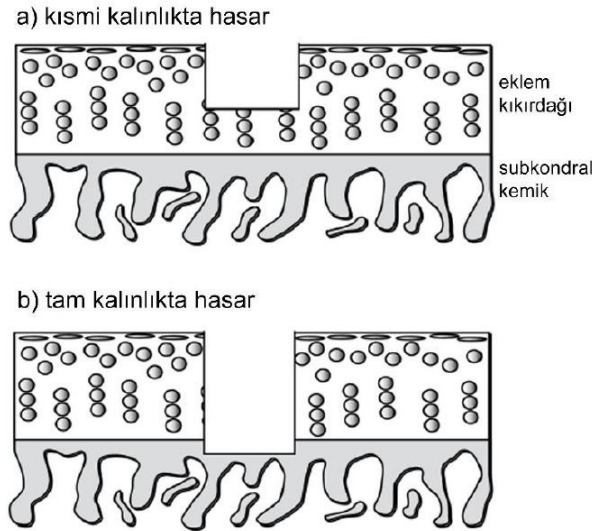
ECM bileşimindeki ve aynı zamanda düzenlenmesindeki farklılıklar osteokondral dokudaki her bir tabakanın mekanik özelliklerini önemli derecede etkilemektedir. Örneğin, süperfisyel tabaka kollajen fibrillerin düzenlendiği yöndeki gerilimlere karşı oldukça dirençlidir ve bu sayede yüzeydeki kayma gerilimlerine karşı dokunun sağlamlığını korur [8]. Dokunun daha da derinliklerine inildikçe, mineralize yapının da başlamasıyla osteokondral dokudaki sıkıştırma kuvveti süperfisyel bölgeye göre birkaç kat fazlalık gösterir [9]. Osteokondral dokuyu oluşturan her bir tabaka, farklı mekanik özelliklere sahiptir ve her bir tabaka arasındaki sıkıştırma modülü büyük farklılıklar gösterir. Süperfisyel, derin tabaka, mineralize kıkırdak ve subkondral kemiğe ait elastik modülleri sırasıyla, 0,079, 2,1, 320 MPa ve 5,7 GPa'dır [10]. Osteokondral ara yüzey, mineralize kıkırdak ve ona bitişik subkondral kemik arasındaki etkileşimi ifade eder. Kollajen fiberler, yapısal olarak derin tabakadan mineralize tabakaya kadar uzanır. Mineralize kıkırdak bölgesindeki endokondral ossifikasyon (doku mineralizasyonu), kemik hayatı boyunca devam eder [6]. Mineralize kıkırdak, mekanik olarak üst kısmındaki tabakalara göre daha sağlam bir yapıya

sahipken, bu yapının mekanik dayanımı altındaki subkondral kemik tabakadan birkaç kat daha düşüktür [10]. Subkondral kemik, insanlarda 0.2-0.4 mm aralığında bir kalınlığa sahip katı kemik olarak tanımlanır. Subkondral kemik trabekülü çok fazla damarlanmıştır ve hem kendi hem de bitişindeki eklem kıkırdığı için gerekli besinlerin taşımını sağlar. Bu bölge, derin tabakada bulunan kollajen fibriller için bir bağlanma bölgesi görevi görür ve en önemli iki görevi eklem bölgesinin şeklini korumak ve dışarıdan gelecek streslerin emilimini sağlamaktır [11]. Kıkırdak, eklemlere bir miktar sıkıştırma mukavemeti kazandırsa da, subkondral kemik, kapladığı alanın büyüklüğü ve düşük elastik modülüyle eklem dayanımının büyük bir kısmını sağlamaktadır [1].

Subkondral kemiğin, osteokondral rahatsızlıkların patolojisinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir [11]. Ayrıca, bu bölgeye uygulanan dış strese bağlı olarak kemiğin yeniden modellenmesine de aktif bir şekilde katıldığı gösterilmiştir [12]. Radin ve diğerleri tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, tavşan dizine belirli miktarlarda yük uygulandığında, eklem kıkırdığında önce subkondral kemikte değişimlerin başladığı gözlemlenmiştir [13]. Dolayısıyla, subkondral kemikteki değişimlerin, osteokondral hasarların erken belirteci olduğu görülmüştür. Aynı zamanda, subkondral kemik miyelin kılıf içermeyen serbest sinir uçlarını yapısında bulundurduğundan, bu bölgenin ağrı üretiminin kaynağı olduğuna inanılmaktadır [14]. Osteokondral hasarlar sonucu eklem kıkırdığının kaybı, alt kısmındaki subkondral kemiği etkiler ve bu bölgeyi ağrıya neden olan birçok dış kuvvete karşı savunmasız bırakmış olur [15].

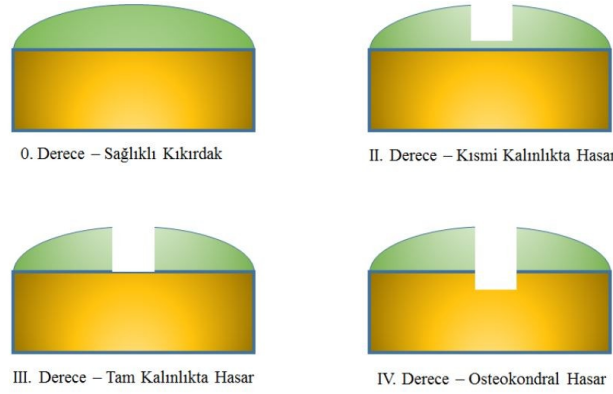
Osteokondrol Hasarlar

Kıkırdak hasarları, hasarın çapına ve derinliğine bağlı olarak kategorize edilmekle birlikte, bu hasarların en kötüsü ve en maliyetlisi osteokondral hasarlardır. Osteokondral ara yüzey, mineralize kıkırdak tabakası ile subkondral kemik plakası arasında sürekli bir kollajen fiber yerleşimi ve varlığı bulunmadığından dolayı, kıkırdak tabakaları arasındaki en zayıf bölgedir. Yetişkin kıkırdak, olgunlaşmamış kıkırdak yapısıyla karşılaştırıldığında, damar içermeyen, ince ve apoptoz eğilimi yüksek bir yapıdır. Bu nedenle, yaş ilerledikçe bu bölgede hasar oluşma riski de yükselir. Bunlara ek olarak, menapoz, diyabet ve inflamasyonu önleyici tedavilerin kıkırdak yapısını zayıflattığı ve kıkırdığı daha kırılabilir bir hale getirdiği çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir [3].



Şekil 2. Eklem kıkırdığında gerçekleşen (a) kısmi kalınlıkta ve (b) subkondral bölgeye kadar penetre etmiş tam kalınlıkta hasarların şematik gösterimi [16].

Çeşitli eklem kıkırdığı hasarları bulunmaktadır. Bunlardan, kıkırdak üzerinde en az zararlı olanı mikrokırıklardır (microfractures). Kıkırdak mikrokırıkları çıplak gözle görülemeyecek boyuttadır fakat karakteristik olarak süperfisyal bölgedeki GAG kaybını etkiler. Kıkırdak mikrokırıkları, eklem kıkırdığının incelmeye ve mineralize kıkırdak tabakasının kalınlaşmasına neden olur [3]. İkinci tür kıkırdak lezyonu ise kondral hasardır. Kondral hasarlar iki kısma ayrılır; kısmi kalınlıkta (partial thickness) ve tam kalınlıkta (full thickness) olanlar (Şekil 2). Kısmi kalınlıktaki kıkırdak hasarları sadece eklem kıkırdığındaki bir problemi belirtirken, tam kalınlıktaki kıkırdak hasarları subkondral bölgeye kadar ilerlemiş kıkırdak problemlerini ifade eder. Eğer hasar subkondral bölgeyi de içeriyorsa bu tür problemlere osteokondral hasar denmektedir.



Şekil 3. Outerbridge Kıkırdak Hasarları Sınıflandırma Sistemi

Kıkırdak lezyonları, bilimsel ve medikal amaçlarla farklı numaralandırma sistemleriyle sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflandırmalardan en yaygını, Şekil 3'te gösterilen “Outerbridge Sınıflandırma Sistemi”dir. Bu yöntemde, beş farklı numaralandırma bulunmaktadır. Outerbridge sistemine göre 0 Derece, sağlıklı kıkırdığı ifade eder. Birinci (I) Derece lezyonlar kıkırdığın şişmesi ve yumuşaması anlamına gelir. Klinikte en çok görülen II. Derece lezyon, çapı 1.5 cm'den küçük olan kısmi kalınlıkta kondral hasarı belirtir. Çapı 1.5 cm'den büyük tam kalınlıkta osteokondral hasar ise III. Derece olarak sınıflandırılır. Subkondral kemik de hasar gördüğü durumlar ise IV. Derece kıkırdak lezyonları olarak isimlendirilir. Outerbridge Sınıflandırma Sisteminin yanında, Noyes ve Stabler Yöntemi, Histolojik/Histokimyasal Sınıflandırma Sistemi ve aynı zamanda Uluslararası Osteoartrit Araştırma Kurumu ve Kıkırdak Histopatolojisi Değerlendirme Sistemi gibi farklı değerlendirme sistemleri de bulunmaktadır [1].

Osteokondral Hasarların Tedavisi

Osteokondral hasarlar, klinikte kullanılan geleneksel yöntemler ya da ileri doku mühendisliği stratejileri kullanılarak tedavi edilebilir. Aşağıdaki bölümde, bu yöntemler kısaca açıklanmıştır.

Klinik yöntemler

Klinik tedavi yöntemleri, osteokondral hasarları tedavi edebilme kapasitelerine göre sınıflandırılmaktadır. Geçici tedavi yöntemleri (palliative treatment methods) genellikle hasarlı kıkırdığın tamamen iyileşmesini sağlamazken, onarıcı tedavi yöntemleri (reparative treatment methods) ise hasarlı bölgeyi bazı biyolojik malzemeler kullanarak iyileştirir. Kıkırdak, kemik ve kıkırdak-kemik ara yüzeyinin kendine özgü yapısından dolayı en ideal yöntem olarak güçlendirici tedavi (restorative treatment) yaklaşımı ön plana çıkmaktadır.

Geçici tedavi yöntemleri (palliative treatment methods)

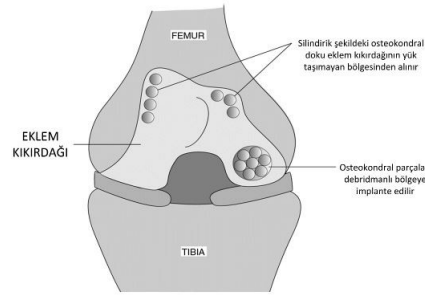
Uppmeier ve diğerlerine göre kıkırdak hasarlarını en az zararlı tedavi edebilen klinik yöntem artroskopik debridman uygulamasıdır [17]. Bu yöntemde, hasarlı kıkırdak ya da kemik bulunduğu bölgeden uzaklaştırılır fakat yöntemin en önemli dezavantajı ise uzaklaştırılan bölgeyi yenisiyle değiştirecek herhangi bir işlemin uygulanmaması olarak söylenebilir. Bu işlem sırasında, hasarlı bölgenin tüm debrisini yıkama ile uzaklaştırılır. Cerrahi olarak çok daha az işlem gerektirse de bu yöntemin büyük çaplı osteokondral hasarların tedavisinde çok faydalı olmadığı görülmüştür [18].

Artroskopik debridmana benzer diğer yöntemler artroplastide ve kondroplastide. Abrezyon artroplastide hasarlı bölgede pürüzlü bir yüzey oluşturulur, bu sayede kan buraya yapışır ve pıhtılaşmaya başlayarak bu bölgede fibröz kıkırdak gelişir. Fakat bu yöntemin dezavantajı ise subkondral bölgeye doğrudan ulaşılabilmesidir. Bu yöntem, debridman yönteminde olduğu gibi femur, tibia veya patella'sında $0.0127 - 0.0254m^2$ 'den daha küçük çapta hasarları olan hastalara uygulanabilmektedir [1]. Kondroplastide ise kıkırdığın düzensizleşmiş köşelerini lazer veya radyo frekansı bazlı algılayıcı kullanarak tıraşlama ve o bölgeyi pürüzsüzleştirme temeline dayanır. Bu yöntem, III. Derece kıkırdak hasarlarının tedavisinde kullanılmaktadır, fakat işlem sırasında dokunun yüksek sıcaklıklara çıkmasıyla kondrositlerin ölüm riski bulunmaktadır [19].

Onarıcı tedavi yöntemleri (reparative treatment methods)

Bir üst bölümde anlatılan yöntemlere göre daha fazla cerrahi işlem gerektiren yöntem mikrokırık (microfracture). Mikrokırık, kondral hasarların tedavisinde kullanılan ilk yöntemdir [20]. Mikrokırık veya subkondral delme işlemi esnasında, delme işlemi sayesinde subkondral bölge uyarılarak mezenkimal kök hücrelerin (MSC) hasarlı bölgeye göçü sağlanır [20, 21]. MSC'ler bu bölgedeki iyileşme sürecini başlatır ve fibröz kıkırdak oluşumuna öncülük eder. Mikrokırık yönteminin, operasyon sonrasındaki 18 ve 36 aylık süreçte faydasının azaldığı görülürken, diz bölgesine uygulanan bir diğer mikrokırık çalışmasında, operasyondan

6-7 yıl sonra diz fonksiyonlarında gelişme elde edildiği gösterilmiştir [22, 23]. Mikrokirik operasyonu sonrasında rehabilitasyon sürecine ihtiyaç duyulmaktadır ve genellikle bu yöntemle iyileşme kondroplasti gibi diğer yöntemlere göre çok daha uzun sürede gerçekleşmektedir [24]. Dolayısıyla, bu yöntem daha çok diğer yöntemlerle birleştirilmektedir.

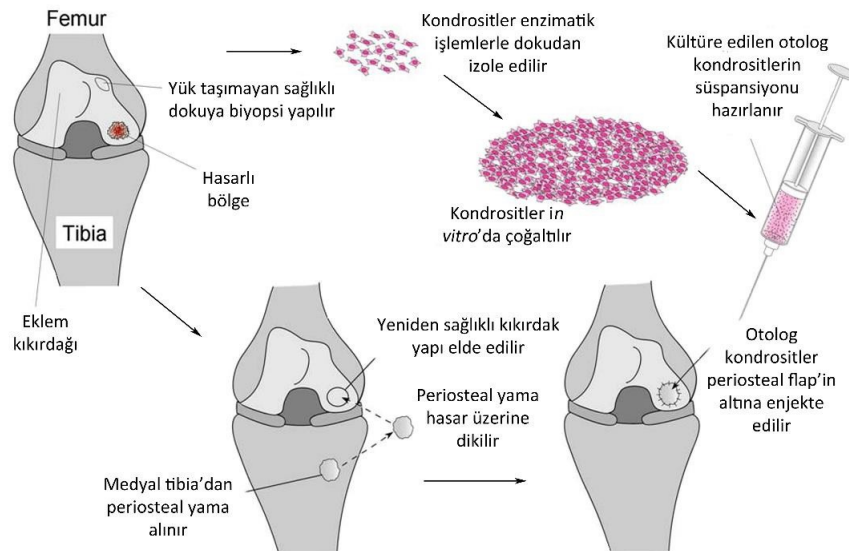


Şekil 4. Mozaikplasti yönteminin şematik gösterimi [16].

Kondral ve osteokondral hasarların tedavisinde kullanılan bir diğer onarıcı yöntem ise mikrokırığa göre daha fazla cerrahi işlem gerektiren allogreft (başka bir bireyden alınan yama malzemesi) ve otogreftlerin (hastanın kendisinden alınan yama malzemesi) kullanımınıdır. Her iki osteokondral greft çeşidi de fokal kıkırdak hasarlarının tedavisinde kullanılan mozaikplasti tekniğine uygulanabilmektedir. Mozaikplasti yöntemi ilk defa L. Hangody tarafından 1990'lar da geliştirilmiştir [25]. Bu yöntemde, daire şeklindeki osteokondral yamalar, ameliyat esnasında vericiden alınarak hasarlı bölgeye implante edilir (Şekil 4). Bu yöntemde, allogreftlerin hastalık yayma, bağışıklık reaksiyonu gibi önemli dezavantajları bulunmaktayken, otogreftler ise birden çok cerrahi işlem gerektirmesi ve yamanın alındığı bölgede kalıcı hasar oluşma gibi sıkıntılar içerir [26].

Güçlendirici tedavi yöntemleri (restorative treatment methods)

Şu anda kullanılan tek güçlendirici tedavi yöntemi otolog kondrosit implantasyonudur (ACI). Bu yöntem, ilk kullanılmaya başlandığı 1990'lı yıllardan beri birçok modifikasyon geçirmiştir [27]. Birinci jenerasyon ACI yönteminde, sıvı kondrosit çözeltilisinin manipülasyon güçlüğü, periosteal dokunun çıkarılması ve kondrositlerin hasarlı bölgeden sızmasını önleyecek bir bariyer oluşturma zorunluluğu gibi yöntemi karmaşıklaştıran zorluklar bulunmaktaydı [28]. İkinci jenerasyon ACI yönteminde ise bu ilk jenerasyondaki sıkıntılar çözülmüş ve iki aşamalı çok daha kolay bir yöntem geliştirilmiştir. İkinci jenerasyon ACI yönteminin ilk aşamasında, artroskopik değerlendirme ve biyopsi işlemi gerçekleştirilir. Biyopsi malzemesi toplandıktan sonra kondrositler izole edilir, *in vitro*'da çoğaltılır. Kondrositler daha sonra hasarlı bölgeye ekilir ve periosteal flap ile çevrelenir (Şekil 5). Carticel R isimli ve FDA tarafından onaylı bir ticari ACI ürünü şu anda klinikte kullanılmaktadır.



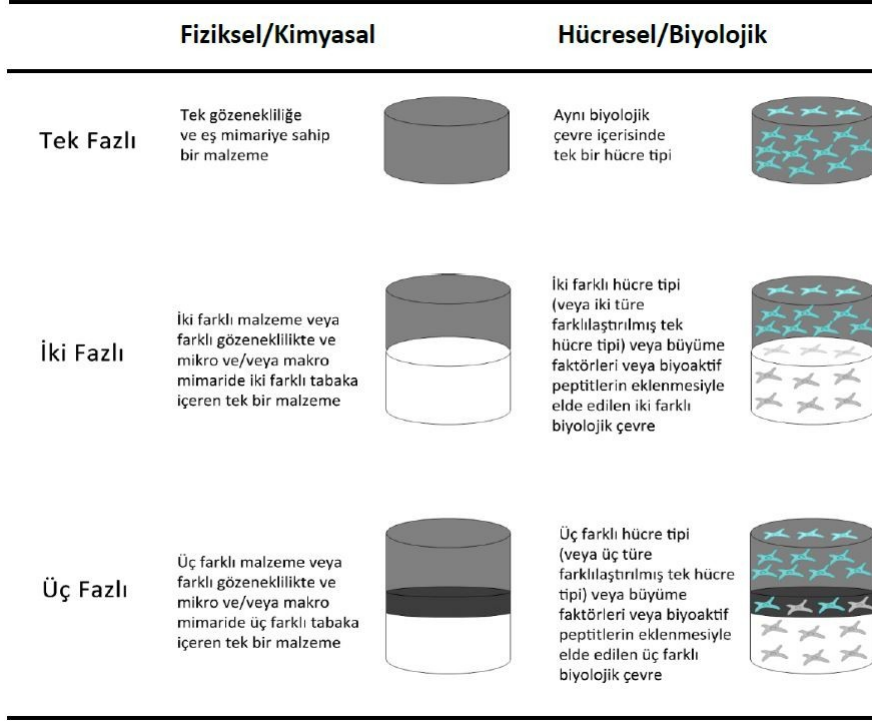
Şekil 5. Otolog kondrosit implantasyonunun (ACI) şematik gösterimi [16].

ACI'nın bir aşama geliştirilmiş formunda ise hastadan izole edilen ve çoğaltılan kondrositler sentetik bir matrisle birleştirilir ve bu yöntem matris-temelli kondrosit implantasyonu (MACI) olarak adlandırılır [29]. Bu yöntemde, biyobozunur matris içerisinde bulunan kondrositler periosteal flap kullanmadan hasarlı bölgeye impante edilir. Hyalograft R ticari adıyla bilinen hiyaluronik asit bazlı kıkırdak yaması klinikte kullanılmaktadır. Genellikle, ACI ve MACI yöntemleri, iki ayrı cerrahi işlem

ihtiyacı, göreceli olarak daha uzun sürede iyileşme ve implante edilen kondrositlerin uzun sürede olgunlaşması gibi kısıtlamaları içermektedir [30].

Osteokondral doku mühendisliği yöntemleri

Diğer doku mühendisliği uygulamalarında olduğu gibi osteokondral doku mühendisliğinin temel bileşenleri; doku iskelesi, hücreler ve büyüme faktörleridir. Osteokondral doku mühendisliğinde kullanılan çeşitli doku iskeleleri, uygun hücre kaynakları ve büyüme faktörleri aşağıdaki bölümlerde detaylandırılmıştır.



Şekil 6. Çeşitli osteokondral doku iskelesi tasarım yaklaşımları [31](John Wiley & Sons yayınevinden izin alınmıştır).

Doku iskeleleri, mühendislik ürünü dokunun gelişimini ve yapısını etkileyebilmektedir. Dolayısıyla osteokondral doku mühendisliği prensibinde, sağlıklı bir doku iyileşmesini sağlayabilmek için doğal dokunun içerisinde bulunduğu *in vivo* kompleks yapıyı göz önünde bulundurmak gerekir. Osteokondral doku iskelesi tasarımları, yapılan çalışmanın amacına bağlı olarak, tek fazlı, iki fazlı veya çok fazlı olarak kategorize edilir (Şekil 6). Tek fazlı yaklaşımlarda, üretilen iskele tek bir malzemeden ya da bileşimi ya da yapısında herhangi bir değişim bulunmayan tek tür bir kompozitten oluşur. Hüresel veya biyolojik açıdan bakıldığında ise tek fazlı doku iskeleleri yapısında birden fazla farklı hücre bulundurmaz ve biyoaktif moleküllerin dağılımı yapı boyunca bir değişiklik göstermez. Diğer yandan, iki fazlı veya çok fazlı doku iskeleleri, çok tabakalı yapı elde etmek için iki veya daha fazla farklı malzemeden, kompozitten veya mimariden oluşur. Bu iskeleler, fiziksel özelliklerine bağlı olarak yapı içerisinde derinlik boyunca değişimler sağlanabilecek tek tür malzemeden de üretilmektedir. Ayrıca çok fazlı doku iskelelerinin farklı katmanlarına farklı türde hücrelerin ekimi veya farklı biyoaktif moleküllerin eklenmesi de mümkündür. Bazı osteokondral doku iskelesi uygulamalarında hala tek fazlı yaklaşım kullanılmasına rağmen, son yıllardaki çalışmalar çok fazlı tasarımlara kaymıştır. Çok fazlı doku mühendisliği yaklaşımlarının en önemli avantajı, kırık ve kemik gelişimine özgü fiziksel veya kimyasal bileşenler içermesidir.

Kırık ve kemik, birbirlerinden farklı yapı, mekanik ve biyokimyasal mikroçevrelere sahiptir ve osteokondral doku mühendisliğinde uygulanan yaklaşımlarda bu farklılıklar gözlemlenmediğinde hasarların iyileşmesi sınırlı kalmaktadır. Tüm bu farklı parametrelerin hepsini aynı anda yapısında bulunduracak doku iskelelerin üretimi çok zor olsa da, fonksiyonel osteokondral yapıların daha kısa sürede üretilmesinde doku farklılıklarını ön plana alan sistemlerin kullanımı gelecekte umut vaat etmektedir [31]. Osteokondral doku mühendisliğinde kullanılan farklı doku iskelesi yaklaşımları, büyüme faktörleri, hücreler ve doğru hücre seçimiyle ilgili bilgiler aşağıdaki bölümlerde anlatılmıştır.

Tek fazlı doku iskeleleri

Osteokondral hasarların tedavisinde doku mühendisliği yaklaşımı yıllardır kullanılmaktadır ve bu alandaki ilk tedavi yöntemi tek fazlı doku iskeleleriyle gerçekleştirilmiştir. Hidroksiapatit veya polikaprolakton ve poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) gibi

polimerler tek fazlı iskeleler olarak osteokondral hasarların tedavisi için araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır [32, 33, 34]. Bu malzemelerin her biri, uygun bozunma hızı, mukavemet, gözeneklilik gibi özellikleri ayarlanacak şekilde üretilebilmektedir. Bu sayede elde edilen biyomalzeme, doku mikroçevresini taklit edebilmekte ve dokunun yeniden yapılanmasına yardım etmektedir. Tek fazlı doku iskelesi denildiğinde, kullanılan malzemenin bileşimi ve fiziksel ve kimyasal özellikleri doku iskelesi boyunca aynıdır. Ayrıca bu iskeleler, birden fazla malzemenin karışımından oluşabilmekte ve yapıya gözenekler boyunca bir jel fazı eklenebilmektedir [35]. Chu ve diğeri 1995 yılında, ticari olarak satılan poli-L-laktik asit (PLLA) küplerini kullanarak osteokondral bir doku iskelesi üretmişlerdir [33]. Bu doku iskelelerine, Yeni Zelanda beyaz taşınlarından izole edilen perikondrositler ekilmiştir. Bu çalışmada, üretilen doku iskelesinin etkinliği hem *in vitro* hem de *in vivo* deneylerle incelenmiştir. Histolojik boyamalar ve tip I ve II kollajen testleri uygulanarak çeşitli performans analizleri gerçekleştirilmiştir. *In vivo* implantasyon sonrası, hücreler tarafından üretilen kollajenin %81'i tip I ise de bu doku iskelesinin hücre yapışmasını ve perikondriyal hücrelerin yapı içerisindeki canlılıklarını desteklediği görülmüştür.

Malda ve diğeri tarafından yapılan bir diğeri çalışmada, sıkıştırarak kalıplama (compression molding) ve 3-boyutlu fiber birikimi (3D fiber deposition) gibi iki farklı doku iskelesi üretim yöntemi kullanılarak, farklı gözenek yapılarına sahip ve biyobozunur poli(etilen glikol) tereftalat/poli(bütilen tereftalat) (PEGT/PBT) doku iskeleleri üretilmiştir [36]. Sıkıştırarak kalıplama yöntemiyle üretilen doku iskelelerinin ortalama gözenek çapı 182 μm iken 3-boyutlu fiber birikimi yöntemiyle üretilen doku iskelelerinin ortalama gözenek çapı 525 μm 'dir. Bu iki iskele mekanik yönden analiz edilmiş, yapılara kondrosit ekilmiş ve 14 günlük kültür gerçekleştirilmiştir. Üç günlük *in vitro* kültürden sonra, sıkıştırarak kalıplama yöntemiyle üretilmiş doku iskelelerinde, 3-boyutlu fiber birikimi yöntemiyle üretilene göre iskele mg'si başına daha fazla DNA bulunmuş fakat 14 gün sonunda iskeleler arasında herhangi bir fark görülmemiştir. Aynı zamanda, iskeleler arasında *in vitro* GAG üretimi açısından bir fark gözlenmemiş, fakat deri altı implantasyonu sonrasında 3-boyutlu fiber birikimi yöntemiyle üretilmiş doku iskelelerinde çok daha fazla GAG üretimi tespit edilmiştir. Ayrıca, 3-boyutlu fiber birikimi yöntemiyle üretilen doku iskeleleri mekanik olarak diğeri yöntemle üretilenlere göre daha iyi sonuçlar vermiştir.

Coburn ve diğeri tek fazlı doku iskelesi tasarımına farklı bir yaklaşım getirmişlerdir [37]. Yaptıkları çalışmada, düşük yoğunluğa sahip poli(vinil alkol)-metakrilat ve yapıya biyolojik etkinlik sağlayan kondroitin sülfat-metakrilat elektroçirilmiş nanofiber doku iskeleleri üretmişlerdir. İskelelerin üretimi, polimerlerin etanol banyosuna elektroçirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Üretilen bu doku iskeleleri ile daha sonra keçiden izole edilen mezenkimal kök hücrelerin *in vitro* kondrojenizi üzerine deneyler yapılmıştır. Kültür sonrasında, fiber doku iskelelerinin hiyalin kıvrıdağa benzer tipik özellikler gösterdiği ve mekanik olarak daha esnek yapıda oldukları görülmüştür. Hücrelerin, doku iskelelerinin iç kısımlarına kadar göç ettiği görülmüş ve yapılarda kıvrıdak benzeri doku oluşumu tespit edilmiştir. Pellet kültür ile karşılaştırıldığında, nanofiber doku iskeleleri, artan ECM üretimi ve kıvrıdağa özgü genlerin ifade seviyeleri ile mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşmasını artırmıştır. Hücre içermeyen nanofiber iskeleler, sıçanda oluşturulan osteokondral hasarın bulunduğu bölgeye implante edildiğinde, hasarlı bölgenin büyük oranda hücre-hücre dışı matris ile kaplandığı ve histolojik boyamalarla bu bölgede yüksek miktarda proteoglikan üretimi görülmüştür. Ayrıca, yapıya kondroitin sülfatın eklenmesiyle kıvrıdağa özgü kollajen olan tip II'nin *in vitro* ve *in vivo* sentezinde önemli oranda artış elde edildiği belirtilmiştir.

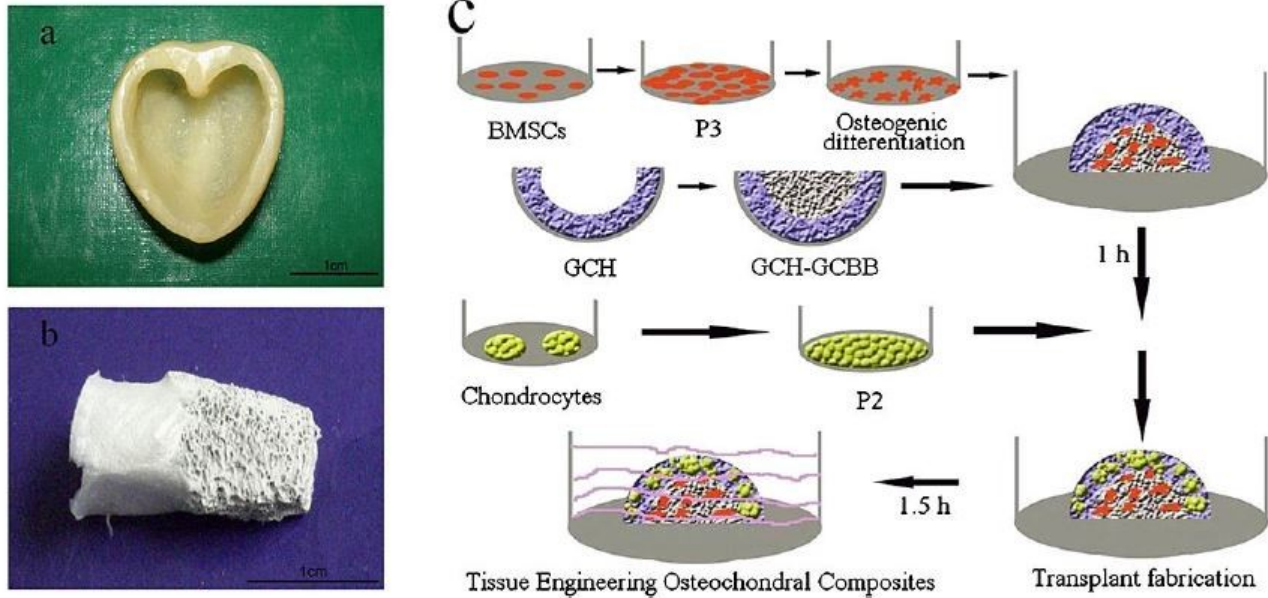
Diğeri bir tek fazlı çok tercih edilen doku iskelesi ise doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla kullanılan kollajen yapılarıdır. Zhou ve diğeri, dondurarak kurutma yöntemiyle kollajen (COL) ve kollajen/hidroksiapatitten (COL/HA) oluşan iki farklı doku iskelesi üretmişler ve bu iskelelere insan kökenli mezenkimal kök hücreler ekmişlerdir [38]. Bu hücrelerin her iki iskele üzerinde osteojenik ve kondrojenik farklılaşmaları, hematoksilen-eozin (H& E), Alcian mavisi, Alizarin kırmızısı ve 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorür gibi çeşitli histokimyasal ve immünohistokimyasal yöntemlerle karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Her iki iskele de ortalama 147 μm gözenek çapındadır ve her iki iskele yüzeyinde de yüksek oranda fibroblast benzeri morfolojide hücre bulunduğu görülmüştür. İskeleler, bazal ortamın aksine kondrojenik ortamda kültüre edildiklerinde Alcian mavisi ve tip II kollajen yönünden pozitif boyama göstermiştir. Benzer sonuçlar, osteojenik ortamda Alizarin kırmızısı ve tip I kollajen ile de elde edilmiştir. Karşılaştırmalı analizler sonucunda, COL doku iskelesinin kondrojenik ortamda ECM oluşumu yönünden daha iyi sonuçlar verdiği görülmüş, osteojenik ortamda ise hidroksiapatitin varlığına bağlı olarak COL/HA doku iskelelerinde daha iyi sonuçlar elde edilmiştir [38]. Yapılan çalışmalarda, tek fazlı doku iskelelerinin kondrosit ve kemik hücrelerinin yapışmasını ve çoğalmasını desteklediği gösterilmiş fakat bu iskelelerin osteokondral doku tedavisinde veya rejenerasyonunda fiziksel yapılarındaki eksikliklerden dolayı yeterli olmadıkları belirtilmiştir.

İki-fazlı ve çok fazlı doku iskeleleri

Osteokondral hasarların yeniden yapılandırılmasında, iki veya çok fazlı doku iskelelerinin daha iyi sonuçlar vereceği düşünölmektedir. Bu yapıların üretiminde, kıvrıdak yapısına ve diğeri subkondral kemik/kemik fazına benzeyen iki farklı malzeme kullanılır. Ayrıca, iki farklı faz arasında geçiş görevi görebilecek bir ara fazın kullanılması da mümkündür [39]. İki farklı fazın birbiriyle bütönlüğü, *in vivo* koşullarda fazların ayrılma olasılığına karşı dikkate alınmalıdır.

Kollajen bu çalışmalarda da doku ECM'sinin en temel protein yapısı olması nedeniyle yoğunlukla kullanılan bir malzeme olarak karşımıza çıkmaktadır. Chen ve diğeri tarafından yapılan çalışmada, üst katmanı kollajen ve alt katmanı PLGA ve

kollajen süngerden oluşan bir osteokondral doku iskelesi üretilmiştir [40]. Çözücü döküm-partikül uzaklaştırma yöntemiyle elde edilen gözenekli PLGA iskele tip I kollajen çözeltisi içerisinde daldırılmış ve daha sonra bu yapı üzerine kollajen asidik çözeltisi eklenerek katılaştırılmıştır. Kemik iliği kökenli MSC'ler (BMSC) kollajen-PLGA/kollajen iki-fazlı doku iskelesine ekilmiş, bir hafta *in vitro* kültür yapılmış ve iskeleler deney hayvanlarının femoral eklem bölgesine implante edilmiştir. İmplantasyon bölgesi incelendiğinde, iskele içeren hasarlı bölge yüzeyinin pürüzsüz olduğu ve doku iskelesinin çevresindeki dokuyla iyi bir entegrasyon sağladığı görülmüştür. İmplantasyondan 4 ay sonra yapılan histolojik boyamalar, kırık ve onun altındaki kemik benzeri yapıların oluştuğunu göstermiştir.



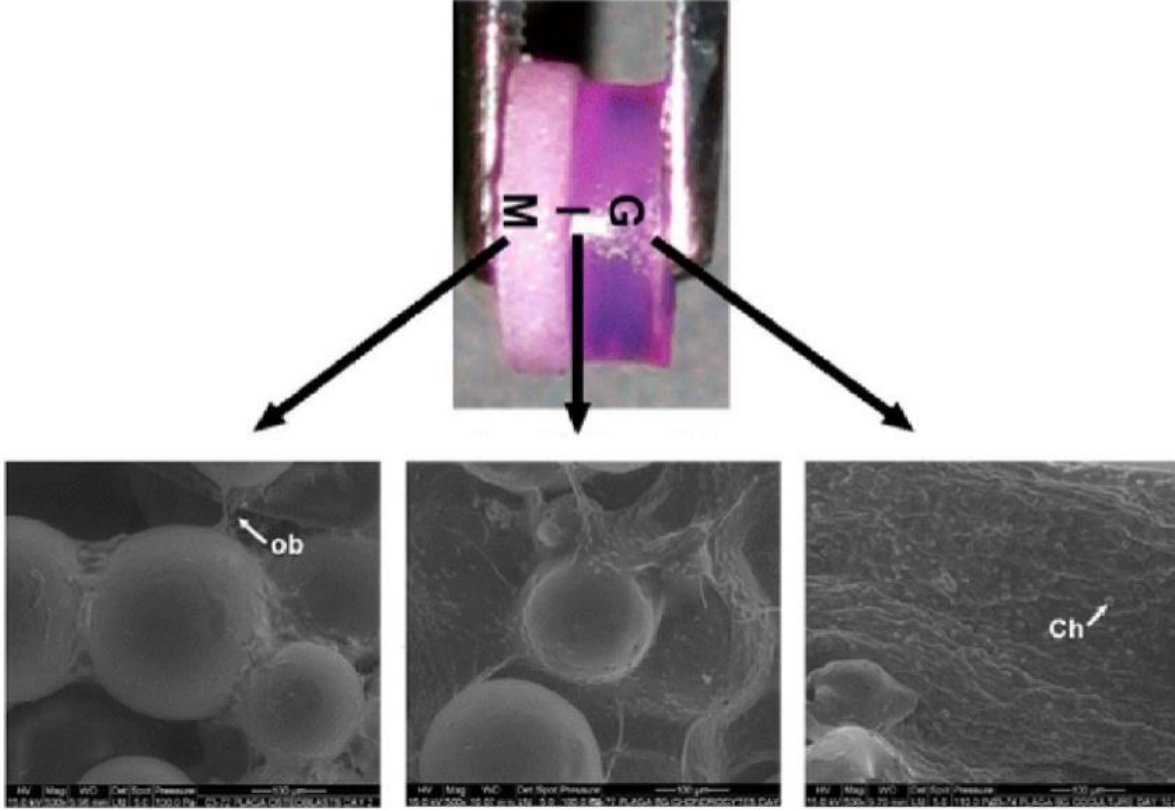
Şekil 7. (a) Distal femur hasarıyla aynı boyutta ve çapta polipropilen negatif kalıp, (b) hazırlanan doku iskelesi; sol, GCH tabakası; sağ, GCBB tabakası, (c) deneysel tasarım şeması [41]. P2 ikinci ve P3 ise üçüncü pasajdaki hücreleri ifade etmektedir (John Wiley&Sons yayınevinden izin alınmıştır).

Deng ve diğerleri tarafından bir fazlı jelatin, kondroitin sülfat ve sodyum hiyaluronattan (GCH) diğer fazı ise jelatin ve sıgır kemik seramiğinden (GCBB) oluşan iki fazlı bir doku iskelesi üretilmiştir (Şekil 7) [41]. Çalışmada kullanılan hücrelerden, tavşan kırıktağından izole edilen kondrositler kondrojenik ortamda ve BMSC'ler ise osteojenik ortamda 5 gün kültüre edilmiştir. Hücre içeren ve hücre içermeyen doku iskeleleri sonrasında Yeni Zelanda tavşanlarının sağ distal femur patellasında oluşturulan osteokondral hasarlara implante edilmiştir. H& E boyamalar düzgün bir kırık tabakasının oluştuğunu göstermiştir. İmplantasyon bölgesi incelendiğinde, kırık ve kemik tabakalarının sıkıştırma mukavemetleri sırasıyla 5.86 ± 0.77 MPa ve 13.44 ± 0.89 MPa olarak bulunmuş ve bu değerlerin doğal osteokondral dokunun sıkıştırma mukavemeti olan 16.05 ± 1.97 MPa değerine çok yakın olduğu görülmüştür. Doku iskelesi incelendiğinde, hücre içeren doku iskelesi yüzeylerinde beyaz hiyalin kırık tabakasının ve aynı zamanda kırık ve kemik benzeri yapıların da oluştuğu belirlenmiştir. Hücre içermeyen doku iskelesinde ise oluşan kemik ve kırık bölgelerinin hücre içerene göre çok daha şeffaf olduğu ve immünohistokimyasal boyamalarda oluşan dokunun hiyalin kırık olmadığı gösterilmiştir.

Çok fazlı doku iskelesinin kullanıldığı bir çalışmada ise kırık bölgesi için çapraz bağlı kollajen-kitosan, kollajen jel ve sıgır kemik büyüme faktörü (bBMP), kemik bölgesi için kollajen ile modifiye edilmiş sıgır süngerimsi kemik ve iki fazlı birbirinden ayıran kollajen bir membran kullanılmıştır [42]. Adipoz kökenli kök hücreler, kollajen jel kullanılarak doku iskelesine ekilmiş ve daha sonra hücre içeren ve içermeyen bu iskeleler Yeni Zelanda beyaz tavşanlarında oluşturulan osteokondral hasarların bulunduğu bölgeye implante edilmiştir. On iki hafta sonunda, histolojik incelemeler, hücre içeren gruplarda osteokondral benzeri dokunun hasarlı bölgeyi tamamen doldurduğunu göstermiştir. Bu bulgular, osteokondral hasarların rejenerasyonunda çok fazlı ve hücre içeren sistemlerin etkinliğini ortaya koymaktadır.

Osteokondral hasarların tedavisinde kullanılmak üzere iki-fazlı doku iskeleler kullanılmakla beraber çok fazlı ve her fazında farklı hücre ve/veya hücre gruplarının ekildiği daha kompleks sistemler de bulunmaktadır. Jiang ve diğerleri agaroz hidrojel, PLGA ve 45S5 biyoaktif camdan (BG) oluşan 3 fazlı doku iskelesi üretmişlerdir (Şekil 8) [39]. Bu fazlar, kırık için kondrosit içeren agaroz hidrojel, kondrosit içeren agaroz hidrojel-PLGA mikroküre ara yüzey ve kemik bölgesi için osteoblast içeren PLGA-BG mikroküre doku iskelesinden oluşmaktadır. Üç fazlı doku iskelesi üzerinde gerçekleştirilen kondrosit-osteoblast ikili kültür (co-culture) sonucunda, kırık bölgesinde bulunan kondrositlerin küresel morfolojide olduğu, ara yüzeyde ise

hem küresel hem de uzamış kondrositlerin bulunduğu ve kemik bölgesindeki hücrelerin ise yayılmış osteoblast-benzeri yapıda oldukları görülmüştür. Her üç bölgedeki hücrelerin de kültür boyunca canlılıklarını korudukları görülmüştür. Her iki bölge için kıkırdak ve kemik yapıya özgü analizler gerçekleştirilmiştir. Kıkırdak tabakasında kültür boyunca kollajen ve GAG üretimi devam etmiştir. Kemik bölgesinde ise mineralizasyonun varlığı Alizarin kırmızısı boyamasıyla gösterilmiştir.

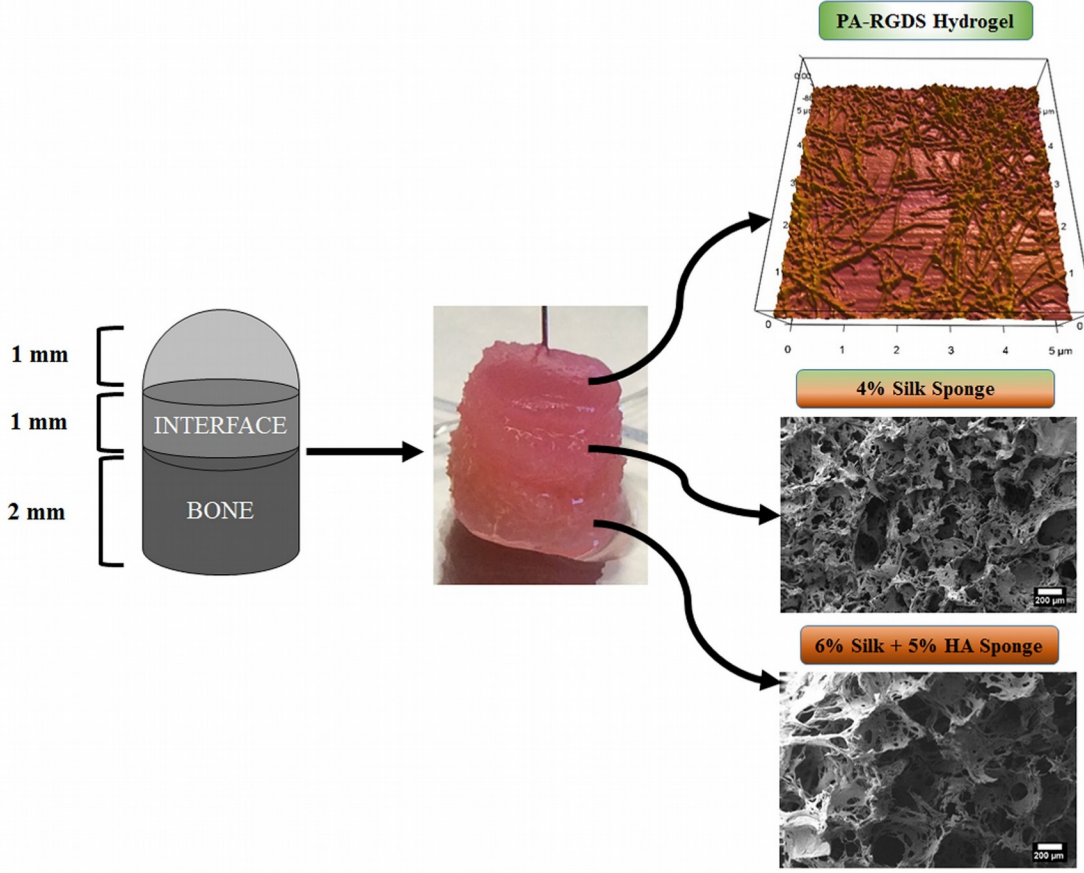


Şekil 8. Çok-fazlı doku iskelesinin genel görünümü. (G) hidrojel, (I) hidrojel + mikroküre ara yüzey ve (M) kemik bölgesi [39] (Springer Nature yayınevinden izin alınmıştır).

Çakmak ve diğerleri tarafından geliştirilen çok fazlı bir osteokondral doku iskelesi üzerinde, kondrosit ve hBMSC ikili kültürleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 9). Bu çok katmanlı doku iskelesinde, kemik ve ara yüzey bölgeleri için farklı gözenek çapına ve mekanik özelliklere sahip ipek doku iskelesi, kıkırdak bölgesi için ise yapısında hücre yapısı, strüktür sekans arjinin-glisin-aspartik asit-serin (RGDS) bulunduran peptit amfilif hidrojel kullanılmıştır. Özellikle ikili kültür ortamında kondrositlerin bulunmasının, hBMSC'lerin osteojenik farklılaşmasını anlamlı bir şekilde artırdığı görülmüş ve geliştirilen bu sistemin osteokondral doku mühendisliği çalışmaları için bir model oluşturabileceği gösterilmiştir. Klinik uygulama aşamasında ve/veya ticari olarak kullanılmaya başlanmış çeşitli ürünler bulunmaktadır. Bu ürünler genellikle doku mühendisliği yaklaşımlarıyla üretilmiş ve cerrahi yöntemlerle birleştirilmiştir [44].

Osteokondral Doku Mühendisliğinde Kullanılan Büyüme Faktörleri

Kemik ve kıkırdak hasarlarının tedavisinde kullanılan doku iskeleleri genellikle tek başlarına yeterli desteği sağlayamayabilir. Çalışmalarda kullanılan hücreler, subkondral kemik bölgesine kadar göç etseler bile bu bölgede beklenen aksine hyalin kıkırdak yerine fibröz kıkırdak oluşumu gözlemlenebilir. Bu iki kıkırdakın birbirlerinden çok farklı olduğu göz önüne alındığında, hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını belirli yönde uyuracak ve hızlandıracak çeşitli büyüme faktörlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Vücut içerisinde bir osteokondral hasar oluştuğunda doğal yollardan büyüme faktörleri salgılanır ancak aynı büyüme faktörlerinin, doku mühendisliği uygulamalarında benzer işlevi sağlaması için çok yüksek derişimlerde kullanılması gerekmektedir (Athanasίου ve diğerleri, 2009). Büyüme faktörleri, *in vitro* ve *in vivo* deneylerde çeşitli yönlerden sıklıkla kullanılmaktadır. İstenilen dokuların rejenerasyonu ve tedavisinde, büyüme faktörleri farklı miktarlarda ve yöntemlerle çeşitli sistemlere eklenmektedir. Ancak istenilen sonuçların elde edilebilmesi için uygun büyüme faktörünün seçimi çok önemlidir.



Şekil 9. Osteokondral doku mühendisliği uygulamaları için model olarak geliştirilen çok fazlı doku iskelesi [43] (John Wiley & Sons yayınevinden izin alınmıştır).

Büyüme faktörleri, osteokondral hasarların tedavisinde birçok şekilde kullanılabilir. Angele ve diğerleri tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, hiyaluronan ve jelatinden oluşan kompozit bir doku iskelesi kullanılmıştır [45]. BMSC'ler, transforme edici büyüme faktörü- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) içeren kondrojenik ortam içerisinde süspansiyon edilmiş ve doku iskelelerine ekilmiştir. Çeşitli zamanlarda gerçekleştirilen histoloji sonuçlarına göre, hücre içeren doku iskelelerinde tip II kollajenle gösterilen ECM üretimi görülmüştür. TGF- $\beta 1$ varlığında 14 gün kültüre edilen doku iskeleleri, farelere implante edilmiş ve *in vitro* çalışmadakilere benzer umut vaat edici sonuçlar elde edilmiştir.

Büyüme faktörlerinin doğrudan kültür ortamına eklendiği çalışmaların yanında, bunların etkinliğini artırmak ve hızlı yarılanma ömürleri gibi kısıtlamalarını azaltmak için çeşitli yollarla doku iskelelerine yüklendiği çalışmalar da bulunmaktadır. Wang ve diğerleri kemik büyüme faktörü-2 (BMP-2) içeren PLGA doku iskelesi ve insülin benzeri büyüme faktörü-I (IGF-I) içeren ipek doku iskeleleri kullanarak çeşitli *in vitro* çalışmalar gerçekleştirmişlerdir [46]. Her iki büyüme faktörü de doku iskelesi üretim aşamasında yapılar eklenmiştir. Bu çalışmada, BMP-2 içeren PLGA, IGF-I içeren PLGA, BMP-2 içeren ipek ve IGF-I içeren ipek olmak üzere dört farklı deney grubu oluşturulmuş ve doku iskeleleri üzerinde insan BMSC'lerin (hBMSC) osteojenik ve kondrojenik farklılaşmaları incelenmiştir. IGF-I içeren PLGA doku iskelelerinde kemik siyaloprotein (BSP) gen ifadesi diğerlerine göre 10 kat fazlayken, en iyi osteojenik farklılaşma BMP-2 içeren ipek doku iskelelerinde görülmüştür. Tip II kollajen gen ifadesine bakıldığında ise hBMSC'lerin kondrojenik farklılaşması, hem BMP-2 hem de IGF-I tarafından uyarılmıştır. Tüm bu sonuçlar çeşitli büyüme faktörlerinin, osteokondral hasarların tedavisinde gerekli olduğunu göstermektedir.

Osteokondral doku mühendisliğinde kullanılan diğer büyüme faktörleri ise BMP ailesinin diğer üyeleri (BMP-7 vs.), TGF- β ailesinden TGF- $\beta 2$ ve TGF- $\beta 3$ ve trombositçe zengin plazma (PRP) olarak sıralanabilir.

Osteokondral Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hücreler Ve Hücre Seçimi

Osteokondral hasarların tedavisi için uygun hücre seçimi büyük önem taşımaktadır. İskelelere ekilen hücreler, doku iskelesinin çevresindeki doku ile etkileşim yolunu değiştirebilmekte ve bu da iyileşme sürecini etkilemektedir. Osteokondral tedavide genellikle iki tip hücre kullanılmaktadır. Bunlar, progenitör yani öncül hücreler ve dokuya özgü hücreler olarak tanımlanabilir. Kök hücreler olarak bilinen öncül hücreler birçok farklı hücre tipine farklılaşabilme yeteneklerinden dolayı araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Dokuya özgü hücreler ise hasarlı bölge etrafında bulunan, kırıkta yeniden yapılandırılması için kondroblast ve kemik için osteoblast olarak adlandırılan hücrelerdir.

Kırıkta dokuya özgü hücreler olan kondrositler, *in vitro* osteokondral doku mühendisliği çalışmalarında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır [35, 47]. Birçok çalışmada da kondrositlerin kullanımıyla daha fonksiyonel kırıkta dokunun elde edildiği görülmüştür [48, 49]. Ancak, kondrositlerin vücutta sınırlı sayıda bulunması (toplam kırıkta hacminin %5'inden az) nedeniyle bu hücrelerin kullanımı deneysel çalışmalarda sıkıntı yaratabilmektedir. Kondrositlerin izolasyonu, bulunduğu kollajen matrisin kollajenaz enzimiyle parçalanmasını gerektirir. Bu işlem hücrelere çok zarar verir [50]. Ayrıca, bu hücreler kültür ve çoğaltma esnasında fenotiplerini kolay kaybeder [51].

Kondrositlerin dezavantajlarını gidermek amacıyla birçok araştırmacı çözüm arayışına girmiştir. Yonenega ve diğerleri tarafından yürütülen bir çalışmada, kondrosit izolasyonu ve kültürü ile ilgili sıkıntılara çözüm aranmıştır [52]. Kondrositlerin izolasyonunda kullanılan kollajenazın zararlarından dolayı, araştırmacılar öncelikle optimum kollajenaz derişimi ve inkübasyon süresini bulmak için çalışmışlardır. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve apoptoz fotometrisi analizleri, kollajenaz derişiminin 24 saatlik inkübasyon için %0.15'e, 6 saat için %0.6'ya ve 4 saat için %1.2'ye düşürülebileceğini göstermiştir. Ayrıca, bu derişimlerle izole edilen hücreler, 1 haftalık kültür sonrasında maksimum sayıya ulaşmıştır. Tüm bu sonuçlar, hücre kazanımında 10 katlık artış elde edildiğini göstermiştir [52].

Sheehy ve diğerleri kondrositlerin proliferasyon yönünden, aynı koşullardaki MSC'lerden çok daha üstün özelliklere sahip olduklarını görmüşlerdir [53]. Domuzdan izole edilen kondrositler ve kemik iliği kökenli MSC'ler, kanallar içeren hidrojellere ekilmiş ve aynı koşullarda kültüre edilmiştir. Toplam 6 haftalık kültür sonunda, mekanik analizler, biyokimyasal ve histolojik boyamalar, kondrositleri içeren hidrojellerde MSC'lere göre çok daha fazla matris birikimine işaret etmiştir.

Kondrositlerin eldesi ve kullanımıyla ilgili yukarıda bahsedilen sorunlardan dolayı, çoğu araştırmacı progenitör hücre olan kök hücrelerle çalışmaya başlamıştır. Kök hücreler, vücudun birçok yerinde bulunur fakat çalışmaların çoğu mezenkimal kök hücrelerle gerçekleştirilmektedir. MSC'ler hızlı üremelerinden ve multipotent özelliklerinden dolayı osteokondral hasarların tedavisi için iyi bir hücre kaynağıdır. MSC'ler dokularda düşük yoğunlukta bulunmaktadır ve bu nedenle klinik uygulamalarda kullanılacak sayıya ulaşmak için laboratuvar ortamında çoğaltılmaları gerekir [54]. MSC'ler, osteokondral hasarların tedavisinde uygun fenotipin eldesi için osteojenik, kondrojenik veya osteokondral ikili kültür ortamında kültüre edilebilir. Ancak bu hücrelerin, *in vivo*'da bir hücre tipinden başka bir hücre tipine beklenmeyen farklılaşmaları görülebilmektedir [55]. Hücreler, tip II kollajen ve agregan gibi kırıkta özgü gen ve proteinleri ifade ederken, aynı zamanda hipertropik belirteçler olan tip X kollajen ve alkalın fosfataz gibi gen ve proteinleri de ifade edebilirler [56, 57].

Kaynaklar

- [1] S. P. Nukavarapu and D. L. Dorcemus, "Osteochondral tissue engineering: current strategies and challenges," *Biotechnology advances*, vol. 31, no. 5, pp. 706–721, 2013.
- [2] B. Alberts, "Molecular biology of the cell: Reference edition. number v. 1 in molecular biology of the cell: Reference edition," 2008.
- [3] K. Athanasiou, C. Zhu, X. Wang, and C. Agrawal, "Effects of aging and dietary restriction on the structural integrity of rat articular cartilage," *Annals of biomedical engineering*, vol. 28, no. 2, pp. 143–149, 2000.
- [4] D. Eyre and J. Wu, "Collagen structure and cartilage matrix integrity." *The Journal of rheumatology. Supplement*, vol. 43, pp. 82–85, 1995.
- [5] T. Aigner, E. Reichenberger, W. Bertling, T. Kirsch, H. Stöss, and K. Von der Mark, "Type x collagen expression in osteoarthritic and rheumatoid articular cartilage," *Virchows Archiv B*, vol. 63, no. 1, p. 205, 1993.
- [6] P. J. Yang and J. S. Temenoff, "Engineering orthopedic tissue interfaces," *Tissue Engineering Part B: Reviews*, vol. 15, no. 2, pp. 127–141, 2009.
- [7] L. Fuentes-Mera, A. Camacho, N. K. Moncada-Saucedo, and V. Peña-Martínez, "Current applications of mesenchymal stem cells for cartilage tissue engineering," in *Mesenchymal Stem Cells-Isolation, Characterization and Applications*. InTech, 2017.

- [8] A. R. Poole, T. Kojima, T. Yasuda, F. Mwale, M. Kobayashi, and S. Laverty, "Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair," *Clinical Orthopaedics and Related Research*, vol. 391, pp. S26–S33, 2001.
- [9] R. M. Schinagl, D. Gurskis, A. C. Chen, and R. L. Sah, "Depth-dependent confined compression modulus of full-thickness bovine articular cartilage," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 15, no. 4, pp. 499–506, 1997.
- [10] P. Mente and J. Lewis, "Elastic modulus of calcified cartilage is an order of magnitude less than that of subchondral bone," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 12, no. 5, pp. 637–647, 1994.
- [11] C. E. Kawcak, C. W. McIlwraith, R. Norrdin, R. Park, and S. James, "The role of subchondral bone in joint disease: a review," *Equine veterinary journal*, vol. 33, no. 2, pp. 120–126, 2001.
- [12] R. R. Pool and D. M. Meagher, "Pathologic findings and pathogenesis of racetrack injuries," *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, vol. 6, no. 1, pp. 1–30, 1990.
- [13] E. L. Radin, R. B. Martin, D. B. Burr, B. Caterson, R. D. Boyd, and C. Goodwin, "Effects of mechanical loading on the tissues of the rabbit knee," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 2, no. 3, pp. 221–234, 1984.
- [14] D. B. Burr, "Anatomy and physiology of the mineralized tissues: role in the pathogenesis of osteoarthritis," *Osteoarthritis and cartilage*, vol. 12, pp. 20–30, 2004.
- [15] K. Moisio, F. Eckstein, J. S. Chmiel, A. Guermazi, P. Prasad, O. Almagor, J. Song, D. Dunlop, M. Hudelmaier, A. Kothari *et al.*, "Denuded subchondral bone and knee pain in persons with knee osteoarthritis," *Arthritis & Rheumatology*, vol. 60, no. 12, pp. 3703–3710, 2009.
- [16] S. Redman, S. Oldfield, C. Archer *et al.*, "Current strategies for articular cartilage repair," *Eur Cell Mater*, vol. 9, no. 23-32, pp. 23–32, 2005.
- [17] H. Upmeier, B. Brüggjenjürgen, A. Weiler, C. Flamme, H. Laprell, and S. Willich, "Follow-up costs up to 5 years after conventional treatments in patients with cartilage lesions of the knee," *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, vol. 15, no. 3, pp. 249–257, 2007.
- [18] J. B. Moseley, K. O'malley, N. J. Petersen, T. J. Menke, B. A. Brody, D. H. Kuykendall, J. C. Hollingsworth, C. M. Ashton, and N. P. Wray, "A controlled trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis of the knee," *New England Journal of Medicine*, vol. 347, no. 2, pp. 81–88, 2002.
- [19] S. Caffey, E. McPherson, B. Moore, T. Hedman, and C. T. Vangsness, "Effects of radiofrequency energy on human articular cartilage: an analysis of 5 systems," *The American journal of sports medicine*, vol. 33, no. 7, pp. 1035–1039, 2005.
- [20] J. R. Steadman, W. G. Rodkey, and J. J. Rodrigo, "Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects," *Clinical Orthopaedics and Related Research*, vol. 391, pp. S362–S369, 2001.
- [21] F. T. Blevins, J. R. Steadman, J. J. Rodrigo, and J. Silliman, "Treatment of articular cartilage defects in athletes: an analysis of functional outcome and lesion appearance," *Orthopedics*, vol. 21, no. 7, pp. 761–768, 1998.
- [22] J. D. Harris, R. H. Brophy, R. A. Siston, and D. C. Flanigan, "Treatment of chondral defects in the athlete's knee," *Arthroscopy*, vol. 26, no. 6, pp. 841–852, 2010.
- [23] J. R. Steadman, K. K. Briggs, J. J. Rodrigo, M. S. Kocher, T. J. Gill, and W. G. Rodkey, "Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up," *Arthroscopy*, vol. 19, no. 5, pp. 477–484, 2003.
- [24] G. Spahn, E. Kahl, T. Mückley, G. O. Hofmann, and H. M. Klinger, "Arthroscopic knee chondroplasty using a bipolar radiofrequency-based device compared to mechanical shaver: results of a prospective, randomized, controlled study," *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, vol. 16, no. 6, pp. 565–573, 2008.
- [25] L. Hangody and Z. Karpati, "New possibilities in the management of severe circumscribed cartilage damage in the knee," *Magyar traumatologia, ortopedia, kezsebeszet, plasztikai sebeszet*, vol. 37, no. 3, pp. 237–243, 1994.
- [26] R. Haene, E. Qamirani, R. A. Story, E. Pinsker, and T. R. Daniels, "Intermediate outcomes of fresh talar osteochondral allografts for treatment of large osteochondral lesions of the talus," *JBJS*, vol. 94, no. 12, pp. 1105–1110, 2012.
- [27] M. Brittberg, A. Lindahl, A. Nilsson, C. Ohlsson, O. Isaksson, and L. Peterson, "Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation," *New england journal of medicine*, vol. 331, no. 14, pp. 889–895, 1994.
- [28] A. Gobbi, E. Kon, M. Berruto, R. Francisco, G. Filardo, and M. Marcacci, "Patellofemoral full-thickness chondral defects treated with hyalograft-c: a clinical, arthroscopic, and histologic review," *The American journal of sports medicine*, vol. 34, no. 11, pp. 1763–1773, 2006.

- [29] E. Kon, P. Verdonk, V. Condello, M. Delcogliano, A. Dhollander, G. Filardo, E. Pignotti, and M. Marcacci, “Matrix-assisted autologous chondrocyte transplantation for the repair of cartilage defects of the knee: systematic clinical data review and study quality analysis,” *The American journal of sports medicine*, vol. 37, no. 1_suppl, pp. 156–166, 2009.
- [30] A. G. McNickle, M. T. Provencher, and B. J. Cole, “Overview of existing cartilage repair technology,” *Sports medicine and arthroscopy review*, vol. 16, no. 4, pp. 196–201, 2008.
- [31] J. E. Jeon, C. Vaquette, T. J. Klein, and D. W. Hutmacher, “Perspectives in multiphasic osteochondral tissue engineering,” *The Anatomical Record*, vol. 297, no. 1, pp. 26–35, 2014.
- [32] S. I. Jeong, E. K. Ko, J. Yum, C. H. Jung, Y. M. Lee, and H. Shin, “Nanofibrous poly (lactic acid)/hydroxyapatite composite scaffolds for guided tissue regeneration,” *Macromolecular bioscience*, vol. 8, no. 4, pp. 328–338, 2008.
- [33] C. R. Chu, R. D. Coutts, M. Yoshioka, F. L. Harwood, A. Z. Monosov, and D. Amiel, “Articular cartilage repair using allogeneic perichondrocyteseeded biodegradable porous polylactic acid (pla): A tissue-engineering study,” *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 29, no. 9, pp. 1147–1154, 1995.
- [34] G.-I. Im and J. H. Lee, “Repair of osteochondral defects with adipose stem cells and a dual growth factor-releasing scaffold in rabbits,” *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 92, no. 2, pp. 552–560, 2010.
- [35] N. T. Khanarian, N. M. Haney, R. A. Burga, and H. H. Lu, “A functional agarose-hydroxyapatite scaffold for osteochondral interface regeneration,” *Biomaterials*, vol. 33, no. 21, pp. 5247–5258, 2012.
- [36] J. Malda, T. Woodfield, F. Van Der Vloodt, C. Wilson, D. Martens, J. Tramper, C. Van Blitterswijk, and J. Riesle, “The effect of pegt/pbt scaffold architecture on the composition of tissue engineered cartilage,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 1, pp. 63–72, 2005.
- [37] J. M. Coburn, M. Gibson, S. Monagle, Z. Patterson, and J. H. Elisseeff, “Bioinspired nanofibers support chondrogenesis for articular cartilage repair,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, no. 25, pp. 10 012–10 017, 2012.
- [38] J. Zhou, C. Xu, G. Wu, X. Cao, L. Zhang, Z. Zhai, Z. Zheng, X. Chen, and Y. Wang, “*In vitro* generation of osteochondral differentiation of human marrow mesenchymal stem cells in novel collagen–hydroxyapatite layered scaffolds,” *Acta Biomaterialia*, vol. 7, no. 11, pp. 3999–4006, 2011.
- [39] J. Jiang, A. Tang, G. A. Ateshian, X. E. Guo, C. T. Hung, and H. H. Lu, “Bioactive stratified polymer ceramic-hydrogel scaffold for integrative osteochondral repair,” *Annals of biomedical engineering*, vol. 38, no. 6, pp. 2183–2196, 2010.
- [40] G. Chen, T. Sato, J. Tanaka, and T. Tateishi, “Preparation of a biphasic scaffold for osteochondral tissue engineering,” *Materials Science and Engineering: C*, vol. 26, no. 1, pp. 118–123, 2006.
- [41] T. Deng, J. Lv, J. Pang, B. Liu, and J. Ke, “Construction of tissue-engineered osteochondral composites and repair of large joint defects in rabbit,” *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, vol. 8, no. 7, pp. 546–556, 2014.
- [42] Z. Cao, S. Hou, D. Sun, X. Wang, and J. Tang, “Osteochondral regeneration by a bilayered construct in a cell-free or cell-based approach,” *Biotechnology letters*, vol. 34, no. 6, pp. 1151–1157, 2012.
- [43] S. Çakmak, A. S. Çakmak, D. L. Kaplan, and M. Gümüşderelioğlu, “A silk fibroin and peptide amphiphile-based co-culture model for osteochondral tissue engineering,” *Macromolecular bioscience*, vol. 16, no. 8, pp. 1212–1226, 2016.
- [44] K. Ye, C. Di Bella, D. E. Myers, and P. F. Choong, “The osteochondral dilemma: review of current management and future trends,” *ANZ journal of surgery*, vol. 84, no. 4, pp. 211–217, 2014.
- [45] P. Angele, R. Kujat, M. Nerlich, J. Yoo, V. Goldberg, and B. Johnstone, “Engineering of osteochondral tissue with bone marrow mesenchymal progenitor cells in a derivatized hyaluronan-gelatin composite sponge,” *Tissue Engineering*, vol. 5, no. 6, pp. 545–553, 1999.
- [46] X. Wang, E. Wenk, X. Zhang, L. Meinel, G. Vunjak-Novakovic, and D. L. Kaplan, “Growth factor gradients via microsphere delivery in biopolymer scaffolds for osteochondral tissue engineering,” *Journal of Controlled Release*, vol. 134, no. 2, pp. 81–90, 2009.
- [47] D. M. Yunos, Z. Ahmad, V. Salih, and A. Boccaccini, “Stratified scaffolds for osteochondral tissue engineering applications: electrospun pdlla nanofibre coated bioglass[®]-derived foams,” *Journal of biomaterials applications*, vol. 27, no. 5, pp. 537–551, 2013.
- [48] R. Mauck, X. Yuan, and R. Tuan, “Chondrogenic differentiation and functional maturation of bovine mesenchymal stem cells in long-term agarose culture,” *Osteoarthritis and cartilage*, vol. 14, no. 2, pp. 179–189, 2006.
- [49] T. Vinardell, S. Thorpe, C. Buckley, and D. Kelly, “Chondrogenesis and integration of mesenchymal stem cells within an *in vitro* cartilage defect repair model,” *Annals of biomedical engineering*, vol. 37, no. 12, p. 2556, 2009.

- [50] Y. Asawa, T. Ogasawara, T. Takahashi, H. Yamaoka, S. Nishizawa, K. Matsudaira, Y. Mori, T. Takato, and K. Hoshi, "Aptitude of auricular and nasoseptal chondrocytes cultured under a monolayer or three-dimensional condition for cartilage tissue engineering," *Tissue Engineering Part A*, vol. 15, no. 5, pp. 1109–1118, 2008.
- [51] E. M. Darling and K. A. Athanasiou, "Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 23, no. 2, pp. 425–432, 2005.
- [52] K. Yonenaga, S. Nishizawa, Y. Fujihara, Y. Asawa, K. Sanshiro, S. Nagata, T. Takato, and K. Hoshi, "The optimal conditions of chondrocyte isolation and its seeding in the preparation for cartilage tissue engineering," *Tissue Engineering Part C: Methods*, vol. 16, no. 6, pp. 1461–1469, 2010.
- [53] E. J. Sheehy, C. T. Buckley, and D. J. Kelly, "Chondrocytes and bone marrow-derived mesenchymal stem cells undergoing chondrogenesis in agarose hydrogels of solid and channelled architectures respond differentially to dynamic culture conditions," *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, vol. 5, no. 9, pp. 747–758, 2011.
- [54] L. M. Ball, M. E. Bernardo, H. Roelofs, A. Lankester, A. Cometa, R. M. Egeler, F. Locatelli, and W. E. Fibbe, "Cotransplantation of ex vivo-expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation," *Blood*, vol. 110, no. 7, pp. 2764–2767, 2007.
- [55] C. Csaki, P. Schneider, and M. Shakibaei, "Mesenchymal stem cells as a potential pool for cartilage tissue engineering," *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, vol. 190, no. 5, pp. 395–412, 2008.
- [56] B. Johnstone, T. M. Hering, A. I. Caplan, V. M. Goldberg, and J. U. Yoo, "In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells," *Experimental cell research*, vol. 238, no. 1, pp. 265–272, 1998.
- [57] G. Shen, "The role of type x collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage," *Orthodontics & craniofacial research*, vol. 8, no. 1, pp. 11–17, 2005.