



T.C.

YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

**KIKIRDAK HASARI TEDAVİSİNDE
İNTRAARTİKÜLER EKSOZOM TEDAVİSİ
(DENEYSEL ÇALIŞMA)**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR. OLCAY EREN

İSTANBUL-2022



T.C.

YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

**KIKIRDAK HASARI TEDAVİSİNDE
İNTRAARTİKÜLER EKSOZOM TEDAVİSİ
(DENEYSEL ÇALIŞMA)**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Turhan ÖZLER**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR. OLCAY EREN

İSTANBUL-2022

TEZ DEĞERLENDİRME TUTANAĞI

Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı'nda gerekli uzmanlık süresini ve rotasyonlarını tamamlayan uzmanlık öğrencisi,

Dr. Olcay EREN'in

“Kıkırdak hasarı tedavisinde intraartiküler eksozom tedavisi (Deneysel Çalışma)” konulu tezi 27.06.2022 tarihinde jürimiz tarafından değerlendirilmiş ve “ **bilime katkı sağlayan orijinal bir çalışma olduğu, tez yazım kurallarına uygun yazıldığı ve aday tarafından başarılı bir şekilde savunulduğu**” için başarılı bulunmuştur.

Uzmanlık Eğitimi Bitirme Sınavı'na girmesi uygun görülmüş olup, bu tutanak düzenlenerek imza altına alınmıştır.

27/06/2022

Jüri Başkanı

Üye

Üye

Prof. Dr. Faik ALTINTAŞ

Prof. Dr. Turhan ÖZLER

Prof. Dr. Oğuz Şükrü POYANLI

TEŞEKKÜR

Yeditepe Üniversitesi Hastanesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim dalında eğitim aldığım süreçte bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen ve yetişmemde sonsuz emeği olan, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum değerli hocam Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Faik ALTINTAŞ'a

Tez danışmanım olan Prof. Dr. Turhan ÖZLER'e bana bu değerli tez konusunu vermesinin yanında uzmanlık eğitimimde verdiği sonsuz katkı ve emeklerinden dolayı çok teşekkür ederim

Bu tez sürecinde her zaman destek olan, bilgi ve tecrübesi ile bana yol gösteren Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN'e teşekkürlerimi sunarım

Bilgi ve deneyimlerini sonsuz cömertlikle sunan eğitim ve öğrenimime yaptıkları katkıları nedeniyle minnettar olduğum değerli hocalarım Prof. Dr. Gökhan MERİÇ'e, Doç Dr. Onur KOCADAL'a Dr. Öğretim Üyesi Burak Çağrı AKSU'ya

Bilgi ve tecrübesi ile bu tez çalışmasının planlı ve doğru bir şekilde yürütülmesini sağlayan ve sonsuz katkılarından ötürü Merve YILDIRIM'a,

Eğitimim sırasında kader birliği yaptığım dostlarım Dr. Alp Er Tunga BÖLÜKBAŞI'na, Dr. Doğukan SAĞIROĞLU'na, Dr. Behiç ÇELİK'e, Dr. Gökberk YILDIZ'a ve Dr. İsmail ÖZDEN'e

Yetişmemde her türlü fedakarlığı yapmış olan babam Aycan EREN'e, annem Naile EREN'e ve kardeşim Melis EREN'e

Tüm hayatımda olduğu gibi tezimin de tüm aşamalarında desteğini benden esirgemeyerek her türlü zorlukta yanımda olan sevgili eşim Simge EREN'e

Hayat enerjim olan canım kızım Lidya EREN'e

Sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İstanbul / Haziran 2022

BEYAN

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

27.06.2022
Dr. Olcay EREN

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.Kıkırdağın katmanları	5
Şekil 2.Kıkırdak lezyonlarının artroskopik görüntüsü	9
Şekil 3.Mikrokırık şematik cerrahi basamakları	13



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.Outbridge sınıflaması	9
Tablo 2.Uluslararası kıkırdak araştırma derneği artiküler kıkırdak yaralanmaları evreleme sistemi	10
Tablo 3.ICRS kıkırdak değerlendirme skorları	31
Tablo 4.ICRS histolojik değerlendirme skorları	33
Tablo 5.Çalışma gruplarının ICRS skorları	36
Tablo 6.Çalışma gruplarının histolojik ICRS skorları	38
Tablo 7.Çalışma gruplarının histolojik ICRS skorlarının karşılaştırılması	39
Tablo 8.Çalışma gruplarının Sox9 gen ekspresyonları	43
Tablo 9.Çalışma gruplarının ACAN gen ekspresyonları	44
Tablo 10.Çalışma gruplarının COL-II gen ekspresyonları	45

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.Mozaikplasti uygulanmış femur kondil kırık lezyonu	14
Resim 2.Çalışmada kullanılan eksozomlar	25
Resim 3.Çalışmada kullanılan cerrahi setler ve ameliyat sahası	26
Resim 4.Cerrahi operasyon için hazırlanan rat	27
Resim 5.Rat dizinde cerrahi örtüm sonrası operasyon balangıç anı	27
Resim 6.Cerrhi operasyon aşamaları	28
Resim 7.Medial femoral kondilde osteokondral defekt	28
Resim 8.Mikrokırık uygulaması	29
Resim 9.İşlem sonrası ratların takip edildiği kafesler	30
Resim 10.Eklemeçi eksozom enjeksiyon uygulaması	30
Resim 11.Medial femoral kondil makroskopik görüntüleri	35
Resim 12.Kontrol grubuna ait histolojik görüntü	36
Resim 13.Sağlıklı kırık kaynaklı eksozom verilen gruba ait histolojik görüntü	37
Resim 14.Kabak eksozom grubuna ait histolojik görüntü	39
Resim 15.Ananas eksozom grubuna ait histolojik görüntü	40
Resim 16.Foreskin eksozom grubuna ait histolojik görüntü	41
Resim 17.Mikrokırık grubuna ait histolojik görüntü	42

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU	II
TEŞEKKÜR	III
BEYAN	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
TABLolar DİZİNİ	VI
RESİMLER DİZİNİ	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
ÖZET	X
ABSTRACT	XI
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.EKLEM KIKIRDAĞININ GENEL ÖZELLİKLERİ	3
2.2.KIKIRDAK DOKUNUN YAPISI	3
2.3.EKLEM KIKIRDAĞININ TABAKALARI	4
2.4.EKLEM KIKIRDAĞININ BİLEŞENLERİ	6
2.4.1.KONDROSİTLER	6
2.4.2.EKSTRASELLÜLER MATRİKS	6
2.4.3.KOLLAJEN	7
2.4.4.PROTEOGLİKANLAR	7
2.4.5.HYALURONİK ASİT	7
2.5.KIKIRDAK LEZYONLARI	8
2.6.KIKIRDAK İYİLEŞMESİ	8
2.7.KIKIRDAK LEZYONLARINDA SINIFLAMA	9
2.8.KIKIRDAK LEZYONLARINDA TEDAVİ SEÇENEKLERİ	10
2.8.1.ARTROSKOPİK DEBRİDMAN	11
2.8.2.KEMİKİLİĞİ STİMÜLASYON TEKNİKLERİ	12
2.8.3.OSTEOKONDRAL OTOLOG TRANSFER	13
2.8.4.MİKROKIRIK VE MATRİKS	14
2.8.5.OTOLOG KONDROSİT İMPLANTASYONU	15
2.8.6.MATRİKSDESTEKLİOTOLOGKONDROSİTİMPLANTASYONU	16
2.8.7.ALLOJENİKOSTEOKONDRALVEYAKONDRALGREFTLEME	16
2.8.8.DOKU MÜHENDİSLİĞİ	17
3.EKSTRASELLÜLER VEZİKÜLLER	18
3.1.EKSTRASELLÜLERVEZİKÜLLERİNSINIFLANDIRILMASI	19
3.1.1.MİKROVEZİKÜLLER	19
3.1.2.APOPTOTİK CİSİMCİKLER	19
3.1.3.EKSOZOMLAR	19
3.2.EKSOZOMLARIN BİYOGENEZİ, YAPISI VE İÇERİĞİ	20
3.3.EKSOZOMLARIN MOLEKÜLER BİLEŞİMİ	21
3.4.EKSOZOMLARIN HEDEF HÜCREYE ALINMASI	22
3.5.EKSOZOMLARINFİZYOLOJİKVE BİYOLOJİK GÖREVLERİ	23
3.6.KIKIRDAK HASARINDA EKSOZOMLAR	24
4.MATERYAL METOD	25
4.1.ÇALIŞMA PLANI	25
4.2.HAYVANLARINHAZIRLANMASI,CERRAHİTEKNİKVEDENEYSELMODEL	26
4.3.DEĞERLENDİRME	31
4.3.1.MAKROSKOPİK DEĞERLENDİRME	31

4.3.2.HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME	32
4.3.3İMMÜNOHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME	34
4.4.İSTATİSTİKSEL ANALİZ	34
5.BULGULAR	35
5.1.MAKROSKOPİK BULGULAR	35
5.2.MİKROSKOPİK BULGULAR	36
5.3.İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR	42
6.TARTIŞMA	46
7.SONUÇ	48
8.KAYNAKLAR	49



ÖZET

GİRİŞ VE AMAÇ

Eklem kıkırdığı hiyalin kıkırdak yapısında olup hasar gördüğü zaman iyileşme kapasitesi oldukça düşük bir dokudur. Henüz optimal bir tedavi yöntemi tanımlanmış olmasa da hücre kaynaklı eksozom tedavi çalışmaları kıkırdak defektleri tedavisinde umut vaat etmektedir. Bu çalışmanın amacı ratların dizlerinde oluşturulan kıkırdak lezyonlarına memeli ve bitki kaynaklı eksozom tedavilerinin kıkırdak iyileşme sürecinde etkilerini incelemek.

MATERYAL METOD

Çalışmada 32 adet sprague-dawley tipi dişi ratın sağ dizleri kullanıldı. Memeli kaynaklı (kıkırdak ve sünnet derisi kaynaklı mezenkimal kök hücre) eksozom grubu, bitki kaynaklı (ananas ve kabak) eksozom grubu, mikrokırık grubu ve kontrol grubu olarak 4 gruba ayrıldı. Ratların sağ dizlerine osteokondral defekt oluşturulduktan iki hafta sonra birer hafta aryla 3 eksozom enjeksiyonu yapıldı. Son enjeksiyondan iki hafta sonra çalışma sonlandırıldı. Sakrifikasyon işlemi sonrası dizler makroskopik, histolojik ve immünohistokimyasal olarak incelendi.

BULGULAR

Deney grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; kıkırdak eksozom grubunun ($p<0.001$), foreskin grubunun ($p<0.001$), ananas eksozom grubunun ($p<0.001$) ve kabak eksozom grubunun ($p<0.001$) ortalama değerlendirme skorlarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır.

Histolojik skorlar incelendiğinde, grupları kendi arasında ve kontrol grubu ile karşılaştırdığımız zaman; kıkırdak eksozomu, foreskin eksozomu, ananas eksozomu ve kabak eksozomu gruplarının ortalama ICRS skorlarında kontrol grubunun skoruna göre istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (sırasıyla; $p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.004$).

SONUÇ

Kıkırdak hasarı tedavisinde, mezenkimal kök hücre kaynaklı veya bitki kaynaklı eksozom kullanımının, kıkırdak iyileşmesi üzerine olan olumlu etkilerinden dolayı, intraartiküler eksozom uygulaması alternatif bir tedavi yöntemi olarak değerlendirilebilir.

ANAHTAR KELİMELER

Kıkırdak, eksozom, osteokondral defekt, mezenkimal kök hücre

ABSTRACT

BACKGROUND AND AIM

Articular cartilage is in the structure of hyaline cartilage and when damaged, it is a tissue with a very low healing capacity. Although an optimal treatment method has not been defined yet, cellular-derived exosome treatment studies show promise in the treatment of cartilage defects. The aim of this study is to examine the effects of mammalian and plant-derived exosome treatments on cartilage lesions formed in the knees of rats on the cartilage healing process.

METHODS

Right knees of 32 sprague-dawley type female rats were used in the study. They were divided into 4 groups as mammalian origin (mesenchymal stem cell originating from cartilage and foreskin) exosome group, plant originating (pineapple and pumpkin) exosome group, microfracture group and control group. Two weeks after the osteochondral defect was created in the right knee of the rats, 3 exosome injections were made at one-week intervals. The study was terminated two weeks after the last injection. After the sacrifice procedure, the knees were examined macroscopically, histologically and immunohistochemically.

RESULTS

When the experimental groups were compared with the control group; A statistically significant difference was found in the mean evaluation scores of the cartilage exosome group ($p<0.001$), foreskin group ($p<0.001$), pineapple exosome group ($p<0.001$) and pumpkin exosome group ($p<0.001$) compared to the control group.

When histological scores were examined, when we compared the groups among themselves and with the control group; A statistically significant difference was found in the mean ICRS scores of the cartilage exosome, foreskin exosome, pineapple exosome and pumpkin exosome groups compared to the score of the control group ($p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.004$, respectively).

CONCLUSION

In the treatment of cartilage damage, intra-articular exosome application can be considered as an alternative treatment method because of the positive effects of using mesenchymal stem cell or plant-derived exosomes on cartilage healing.

KEYWORDS

Cartilage, exosome, osteochondral defect, mesenchymal stem cell

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Eklem kıkırdağı, hareket sisteminin ağrısız ve rahat hareket etmesini sağlamak için yükü kemik dokusuna iletebilen, sürtünmesiz, aşınmaya dayanıklı bir yüzey sağlar. Mezodermal kökenli özelleşmiş bir bağ doku olan eklem kıkırdağı hücreden fakir, lenfatik ve vasküler yapılardan yoksun olmakla beraber kondrositler tarafından üretilmiş bol miktarda ekstrasellüler matriks içeren bir yapıya sahiptir. Eklem kıkırdağı her ne kadar hyalin kıkırdak yapısında olsa da, diğer hyalin kıkırdaklardan (nazal ya da trakea kıkırdakları gibi) ayıran bazı özellikleri vardır. Subkondral kemik komşuluğunda kalsifiye kıkırdaktan başlayıp eklem yüzeyine doğru dikey ilerleyen ve yüzeyde açılanarak paralel seyreden tip II kollajen lifleri organizasyonuna ve bu liflerin arasında kolonlar halinde yerleşmiş sferik hücreler ile yüzeyde yassılaştırmış kondrositler şeklindeki bir mimariye sahiptir. Bu kompleks mimari, eklem yüzeyine binen yükü taşıyabilmek adına özgün bir yapıya sahip olup, çeşitli yöntemlerle sağlanan tamir dokusunda amaç bu yapıyı tekrardan oluşturmaktır.

Eklem kıkırdağın avasküler yapısı, düşük hücre yoğunluğu ve mitoz aktivitesindeki yetersizlik yaralanmalar sonrası iyileşmeyi kısıtlamaktadır. Hasarlanma sonucu oluşan defekt ya hiç iyileşmemekte ya da fibröz doku veya fibröz kıkırdak olarak iyileşmektedir. İyileşme dokusunda hyalin kıkırdak da bulunabilmektedir. Ancak, daha çok tip II kollajenin hakim olduğu hyalin kıkırdak yerine tip I kollajen yoğunluklu fibröz kıkırdak oluşur ki bu kıkırdak tipi mekanik ve aşınma özellikleri açısından hyalin kıkırdağın yerini tutmaktan uzaktır. Bu nedenle kıkırdak hasarında tedavi yöntemlerinin hedefi sadece defektif sahanın doldurulması değil, fonksiyonel olarak eklemdeki yüklenmelere yanıt verebilecek ve histolojik açıdan çevre dokuyla uyum gösterecek hyalin kıkırdak yapısı oluşturmaktır.

Kıkırdak lezyonların tedavisinde tanımlanan ve güncel olarak kullanılan birçok tedavi alternatifi olmasına karşın ideal tedavi tekniği tanımlanabilmiş değildir. Bugün için mevcut onarım stratejileri; palyatif (artroskopik debridman ve lavaj), intrinsik onarımı sağlayıcı (mikrokirik veya nanokirik gibi kemik iliğini uyarıcı) ve rekonstrüktif (osteokondral greftleme ve otolog kondrosit implantasyonu) yöntemler başlıkları altında gruplanır. Bu işlemlerle çoğu hasta için klinik iyileşme bildirilmesine rağmen hyalin eklem kıkırdağının biyolojik ve biyokimyasal özelliklerini gösteren bir yöntem sağlanamamıştır.

Son yıllarda biyolojik tedavi yöntemlerinin güncellenmesi ve hücre tabanlı tedavilerin gündeme gelmesi ile kıkırdak lezyonlarının tedavisinde ciddi yol alınmıştır. Mezenkimal kök hücrelerin kondrositlere farklılaşma potansiyelleri nedeniyle yeni bir tedavi stratejisi olarak dikkat çekmiştir. Kemik iliği, adipoz doku, sinovyal doku, umbilikal kord kanı ve amnion sıvısı kök hücre izolasyonu için sıklıkla kullanılan kaynak dokulardır. Doku iskelelerine implante edilerek defektif sahaya yerleştirilen kök hücre uygulamaları ve herhangi bir iskele kullanılmadan yapılan uygulamalarla ilgili çalışmalar ideal tedaviyi bulmak adına devam etmektedir. Bununla beraber bu tedavi yöntemlerinde kendine özgü bazı kısıtlamaları ortaya çıkmıştır. Artmış donör yaşı nedeniyle proliferasyon kapasitesinin sınırlı olması ve teknik olarak hücrelerin izolasyonu ve toplanması, uygun ortamda saklanması ve uygun şekilde transportu kullanılabilirliklerini zorlaştırmaktadır. Bunlara ek olarak, immün reaksiyon, tümörigenesis ve istenmeyen bir etki olduğu taktirde transplante edilen hücrenin dokudan ayrıştırılamaması gibi canlı hücre kullanmanın getirdiği bazı dezavantajlar mevcuttur. Bu

kısıtlamalar nedeniyle hedef dokuda istenilen etkileri oluşturan hücreden bağımsız hücre ürünlerinin kullanımı gündeme gelmiştir.

Mezenkimal kök hücreler mikroçevreyi ve dokudaki diğer hücreleri etkileyen sitokinleri, büyüme faktörlerini ve pek çok çeşitli çözünür fonksiyonel faktörleri salgılamaktadır. Ayrıca bunların yanında hedef hücre ile iletişimi modüle eden eksozom gibi hücre dışı veziküller de salgılanmaktadır. Mezenkimal kök hücrelerden türetilen eksozomlar doku mühendisliğinde hücre temelli tedavilerin getirdiği sınırlamaların üstesinden gelen yeni bir alternatif tedavi yöntemi olarak önem kazanmaktadır. Eksozomlar hücreler arası iletişimi sağlayan küresel şekilli, iki lipit tabakalı membran ile çevrili keseciklerdir ve sinyal iletimi, genetik madde aktarımı, bağışıklık yanıtının düzenlenmesi gibi birçok biyolojik işlevde rol oynar. Hücreler arası iletişimde hatta türler arası veya canlı alemleri (bakteri-memeli, bitki-memeli) arasında iletişimde rol aldıkları belirtilmektedir. Eksozomların farklı organizmalarda salgılanma mekanizmaları büyük benzerlikler içerdiğinden eksozom aracılı hücreler arası haberleşmenin evrimsel olarak korunduğu bildirilmektedir. Eksozomlarda paketlenmiş biyolojik bilgilerin hücreler arasında aktarılabilirdiği ve alıcı hücrelerin fenotipini değıştirdiğı bilgisiyle beraber bu konuyla ilgili çalışmalar hız kazanmıştır.

Mezenkimal kök hücreden türetilen eksozomların, kıkırdak dokusunda hücresel proliferasyonu, migrasyonu ve matriks sentezini artırarak, apoptozu azaltarak ve bağışıklık tepkisini modüle ederek kıkırdak onarımını hızlandırdığı belirlenmiştir. Biz bu çalışmada memeli ve bitki kaynaklı eksozomların in vivo ortamda kıkırdak hasarını onarma potansiyellerini, mevcut tedavi yöntemlerine bir alternatif tedavi yöntemi olma potansiyelini ve bu tamir süreci esnasında eksozomların immünojenik ve onkojenik reaksiyonlarını incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. EKLEM KIKIRDAĞININ GENEL ÖZELLİKLERİ

Kıkırdak mezodermal kökenli özelleşmiş bir bağ dokudur. Düşük sürtünme katsayısı ve kaygan yüzeyi ile kemiklerin birbiri üzerinde düzgün bir şekilde kaymasını, rotasyon yapmasını ve yükün aktarılmasını sağlayan eklemlerimizdeki kemik yüzeylerini kaplayan, pürüzsüz, kaygan, beyaz ve dayanıklı bir dokudur. Eklem kıkırdağının serbest yüzeyi eklem boşluğuna bakarken serbest olmayan yüzeyi subkondral kemik plağına tutunur (1,2).

Kompleks bir mimariye sahip olan eklem kıkırdağı, esasen tek bir hücre tipini, yani kondrositleri çevreleyen ekstraselüler matriksten meydana gelmektedir. Eklem kıkırdağı içerisinde herhangi bir kan damarı, lenf damarı veya sinir yoktur. Ekstraselüler matriks azalan konsantrasyonlarda su, proteoglikan, kolajen (esasen tip II) ve birtakım farklı proteinler ve glikoproteinlerden meydana gelmektedir. Kıkırdağın beslenmesi, sinovyal sıvıdan ve bazal subkondral kemikten basit difüzyon ile gerçekleşmektedir (3,4). Yetişkin dönemde ise kıkırdağın beslenmesi daha baskın olarak sinovyal sıvıdan kaynaklanmaktadır. Bu nedenle yaş ilerledikçe kemik iliğine doğru vasküler invazyon olmakta ve kıkırdak kalitesi de olumsuz yönde etkilenmektedir (5). Eklem kıkırdağı, ağırlık kuvvetlerini dağıtarak eklem yüzeylerini korumanın yanında amortisör görevi de görür. Eklem kıkırdağının temel işlevi, düşük sürtünme katsayılı ve kemikler arasında düzgün kayma hareketine izin veren yüzey oluşturmaktır.

2.2 KIKIRDAK DOKUNUN YAPISI

Eklem kıkırdağının yapısı, kondrositler ile üç boyutlu bir kollajen fibril ağı içinde sıkışmış proteoglikanlar ve matriks proteinlerinden oluşan bir ekstraselüler matriks ve yaş ağırlığının %65-80'ini oluşturan sudan meydana gelir (1,6). Ekstraselüler matriksin bileşimi ve yapısal bütünlüğünü, kıkırdağın yük altında şeklini, esnekliğini ve direncini korumasını sağlar. Fizyolojik düzeyde yüklenmeler, dokunun fonksiyonuna uyumunu artıracak şekilde, hücrelerin matriks metabolizmasını devam ettirmelerini sağlar. Kollajen fibril ağı gerici ve makaslayıcı yüklere, proteoglikanlar sıkıştırıcı yüklere karşı dokunun dinamik gücünü oluştururlar. Bu fonksiyonel dayanışma, katmanlı bir yapı ile sağlanır (7,8)

Eklem kıkırdak kalınlığı vücuttaki lokalizasyonuna göre değişkenlik göstermesine rağmen yaklaşık 1-7 mm arasında ince bir tabaka halindedir (9) Bu doku, temas için toplam yüzey alanını artırarak deforme olabilir, böylece toplam stres azaltılır. Eklem kıkırdağının viskoelastik özelliğini gösteren stres gevşemesi, uygulanan yükler karşısında oluşan hasara karşı direnci gösteren benzersiz bir fonksiyondur (10). Eklem kıkırdağının kompresif ve sürtünme kuvvetlerine karşı olan direnç fonksiyonu, ekstraselüler matriks moleküllerinin spesifik düzenine bağlıdır. Özellikle, kollajen liflerinin mimarisi, uygulanan strese bağlı olarak deformasyon miktarını ve yönünü büyük ölçüde belirlemektedir (11).

Eklem kıkırdağının yapısı; yüzeysel tabaka (tanjansiyel), geçiş tabakası (transitional zone), derin tabaka (radial \ orta tabaka) ve kalsifiye tabaka olmak üzere dört ayrı tabaka şeklinde incelenir(9,12). Her bir tabakadaki ekstraselüler matriks ise: perisellüler bölge, teritoryal bölge ve interteritoryal bölge şeklinde üç bölgeye ayrılır (9).Eklem kıkırdak tabakaları ve ekstraselüler matriksin bölgeleri yapısal ve fonksiyonel olarak birbirlerinden farklılıklar

göstermelerine karşın; birbirleri arasındaki sınırlar çok belirgin değildir. Yüzeyel tabakada kondrositler ve kollajen lifleri eklem yüzeyine paralel şekilde dizilmişlerken, derine doğru hem hücreler hem de kollajen lifleri eklem yüzeyine göre dikleşerek dizilim göstermeye başlarlar ve derin tabakada kondrositler yüzeye göre tam dik şekilde kolonlar oluşturarak organize olurlar. Yüzeyel tabakada kondrositler elipse benzer şekilde iken alt tabakalarda daha yuvarlak şekillidirler (9, 11, 12).

Kıkırdak, lenf, sinir ve kan damarından yoksun olmakla beraber, beslenme çevre dokulardan difüzyon yoluyla olmaktadır. İçerik ve fonksiyon açısından hyalin, elastik ve fibröz olmak üzere üç tip kıkırdak vardır.

Hyalin kıkırdak en yaygın bulunan kıkırdak doku alt tipidir. Çoğunluğunu Tip-2-Kollajen oluşturur. Embriyolojik dönemde geçici iskelet olarak görev alır, kademeli olarak kemik dokuya dönüşür. Glikozaminoglikan içeriği zengindir. İskelet sisteminde epifizyel plaklarda, solunum yollarında, kostaların sternumla bileşkesinde ve eklem yüzlerinde bulunmaktadır. Hyalin kıkırdak matriksinin %70'ini su, %15'ini Tip-2-Kollajen, %10'unu proteoglikan ve kalan kısmını diğer kollajenler meydana getirir. Hyalin kıkırdak içerisinde en fazla bulunan pretoeglikan agregan olmakla beraber matriks dışında kalan kısmının büyük kısmını da Tip-2-Kollajen oluşturmaktadır(12-14).

Elastik kıkırdak, hyalin kıkırdağa benzer fakat matriks ve pekondriyum elastik lif içerir. Daha esnek ve bükülebilirdir, bu özelliğine yapısında tip II kollajene ek olarak bol miktarda bulundurduğu elastik lifler sayesinde sahiptir. Hyalin kıkırdağa göre daha fazla kondrosit içerirler. Elastik lifler yoğunlaşmış ağ şeklinde elastik kıkırdakta bulunmaktadır. Kulak kepçesi, dış kulak yolu, östaki tüpü ve larenks (epiglottis, aritenoid kıkırdak vokal proses) yapısına katılmaktadır(15).

Fibröz kıkırdak, perikondrium içermez, matriks tip I kollajene sahiptir. Hyalin kıkırdak ile bağ dokusu arasında bir yapıya sahiptir. Dermatan sülfat ve kondroidin sülfatça zengin az bir matrikse sahiptir. Burada kondrositler fibroblastlardan köken alırlar. Tendon ve bağların kemiğe yapışma yerinde, menisküslerde ve iyileşen eklem kıkırdağında bulunur (16).

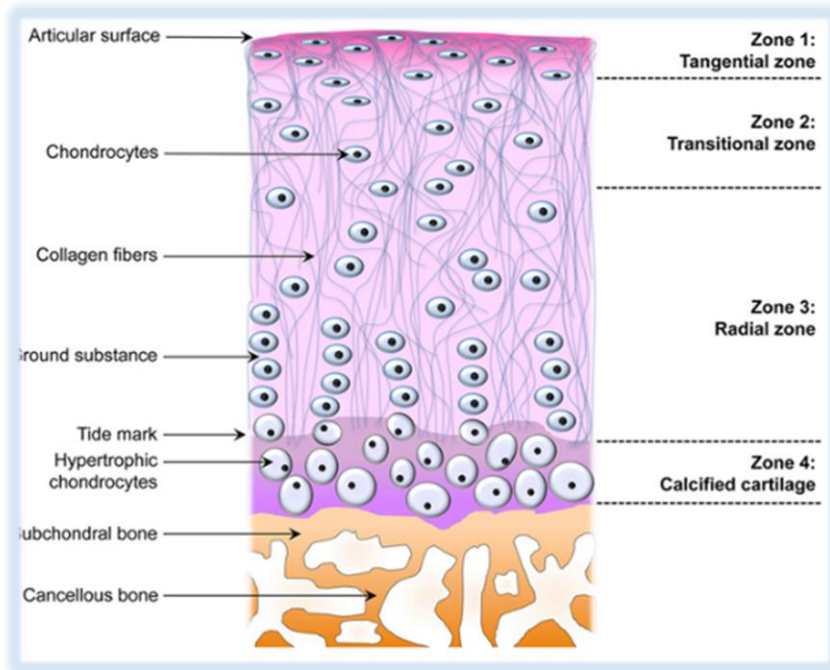
2.3.EKLEM KIKIRDAĞININ TABAKALARI

Yüzeyel Tabaka (Tanjansiyel) : Eklem yüzeyini oluşturan kıkırdağın en üstte yer alan tabakadır. Tüm eklem kıkırdak kalınlığının %10-20'sini oluşturur (9). Yüzeyel tabaka iki ayrı tabakadan meydana gelmektedir. En üstte, eklemin kaygan yüzü üzerinde yer alan lamina splendens, fibriller ve çok az miktarda prostoglandin içeren ancak hücre barındırmayan bir katmandır. Bu katmanın altında ise kollajen lifleri ve oval şekilli kondrositler yüzeye paralel dizilmişlerdir (17,18). Bu tabaka prostoglandin konsantrasyonu en az ve prostoglandin agregatları en küçük, su miktarı ve fibronektin konsantrasyonu ise en fazla olan kıkırdak tabakasıdır. Bu tabakadaki kondrositler; prostoglandinleri daha hızlı bir şekilde yıkarken, kollajen ve prostoglandinleri daha az sentezlediği ortaya konulmuştur. Yüzeyel tabaka kollajen liflerinin yüzeye paralel bir diziliş yapısı sergilemesi, bu takaya germe ve makaslama kuvvetlerine karşı dayanıklılığı sağlar. Ayrıca alttaki tabakaların sıkıştırıcı güçlere karşı olan dayanıklılıklarına da katkı sağlar. Bu tabakanın kıkırdak dokudan uzaklaştırılması dokunun geçirgenliğini artırarak dokunun kompresyon kuvvetlerine karşı dayanıklılığını azaltır. Yüzeyel tabaka aynı zamanda sinovyal sıvı ile matriksin derinlikleri arasında bir bariyer görevi de yaparak, kıkırdak dokusunun bağışıklık sisteminden izole edilmesini ve eklem içindeki zararlı maddelerden korunmasını sağlar(19).

Geçiş Tabakası (Transizyonel) : Bu tabaka eklem kıkırdak kalınlığının %40–60'ını oluşturur ve tabakadaki kollajen lifleri, daha az organize şekilde olup düzensiz bir biçimde dizilmişlerdir. Geçiş tabakasındaki kondrositler, yüzeysel tabakadakilere göre biraz daha büyük ve yuvarlak görünümündedir. Bu tabakada kondrositler tek başlarına bulunabilecekleri gibi hücre grupları olarak da bulunabilirler(17,18). Mikroskopik incelemede, bu tabakadaki kondrositler daha fazla endoplazmik retikulum ve golgi aygıtı içerdikleri için metabolik olarak daha aktif hücrelerdir. Ekstrasellüler matrikste ise yüzeysel tabaka seviyesine göre daha çok prostoglandin varken, su içeriği azalmıştır (19).

Derin tabaka (radial /orta tabaka) : Prostoglandin yoğunluğu en fazla olan ve su içeriği en az olan kıkırdak tabakası derin tabakadır. Kıkırdak kalınlığının yaklaşık %30'unu meydana getirir. Eklem yüzeyine dik olacak şekilde organize olmuş kalın kollajen lifleri içerir. Kondrositler ise yuvarlak şekilli olup eklem yüzeyine dik kolonlar şeklinde dizilmişlerdir (20,21).

En alt tabaka (kalsifiye): Eklem kıkırdak dokusundaki en alt tabakadır. Tip X kollajen üreten hipertrofik kondrositler içerir. Bunun sonucunda yapısal bir bütünlük sağlanır ve kıkırdağa etki eden kuvvetlere karşı direnç oluşturur (22). Bu tabakayı derin tabakadan ayıran içeriği tam olarak aydınlatılamamış tidemark denilen bir yapı bulunmaktadır (9). Derin tabakadaki kollajen lifler, tidemark adı verilen kısmın içine doğru uzanırlar. Yaşın ilerlemesi ile birlikte kıkırdak kalınlığı azalarak tidemarkın yüzeye yaklaşmasına neden olur, böylece derindeki kalsifiye kıkırdak doku kemik dokusuyla yer değiştirir. Kalsifiye tabaka, üstündeki hiyalin kıkırdağı altındaki subkondral kemik dokusuna bağlayarak kıkırdak ile kemik arasında bir geçiş noktası oluşturur. Bu tabaka, besin maddelerinin subkondral kemikten kıkırdağa geçişine engel olarak kıkırdağın yalnızca sinovyal sıvıdan beslenmesini sağlar. En alt tabakadaki kıkırdak hücreleri, üst tabakalardaki hücelere göre boyut olarak çok daha küçüktür ve çok az miktarda endoplazmik retikulum ve golgi aygıtı içerir. Bu hücreler bazı bölgelerde tamamen kalsifiye matriks ile çevrelenmiş olup, metabolizmaları da çok yavaştır(17,19) (Şekil 1).



Şekil 1: Kıkırdağın katmanları

2.4.EKLEM KIKIRDAĞI BİLEŞENLERİ

Eklem kıkırdığı ekstrasellüler matriks ve kondrositlerden oluşur. Ekstrasellüler matriksin ana bileşenleri su, proteoglikanlar, kollajen, glikoproteinler ve diğer proteinlerdir. Hyalin kıkırdığının homeostazı başlıca kondrositler tarafından sağlanır. Kollajen, kıkırdakların gerilme ve yırtılma özelliklerini sağlar ve matriks içindeki proteoglikanları hareketsizleştirir (18,23,24). Kıkırdakların mekanik davranışı, kollajen, proteoglikanlar ve interstisyel sıvı bileşenler arasındaki etkileşime bağlıdır. Hyalin kıkırdığının mekanik kuvveti, katı matrisin geçirgenliği, dokudaki interstisyel sıvının akışı, katı ve sıvı fazları arasındaki denge ile belirlenir (25).

2.4.1.KONDROSİTLER

Kondrositler eklem kıkırdığının esas hücreleridir ve bütün kıkırdak hacminin yalnız %1'ini meydana getirirler. Kondrositler, eklem kıkırdak dokusunda eşsiz bir hücre tipidir ve kıkırdak oluşumu ve işlevselliği için gereklidir. Mezenkimal kök hücrelerden ortaya çıkar ve TGF- β süper ailesi, fibroblast büyüme faktörleri ve insülin benzeri büyüme faktörü-1'i içeren bir dizi sitokin ve transkripsiyon faktörü etkileşimi ile düzenlenir (26). Kondrositler ekstrasellüler matriksin devamlılığını sağlayan özelleşmiş bir mikro çevre oluşturur. Bu mikro çevre kondrositi kendi matriksi içinde tutar ve bitişik kıkırdak alanlarına göçünü engeller. Nadiren kondrositler, doğrudan sinyal iletimi ve hücreler arasındaki iletişim için hücreden hücreye temas oluştururlar. Ancak büyüme faktörleri, mekanik yükler, piezoelektrik kuvvetler ve hidrostatik basınçlar dahil olmak üzere çeşitli uyaranlara cevap verirler Hücre dışı matriks ile sürekli iletişim içindedir. Yuvarlak veya oval çekirdekli, çekirdeğe yakın hücre merkezinde bir çift sentriol ve iyi gelişmiş bir golgi aygıtı içeren hücrelerdir (27).

2.4.2.EKSTRASELLÜLER MATRİKS

Ekstrasellüler matriks üç kısımda incelenir. Kondrositleri etrafındaki matrikse bağlayarak hücreyi eklem yük alması sırasında meydana gelen sıkıştırma ve bozulma kuvvetlerine karşı koruyan perisellüler matriks ile teritoryal matrikstir. İlaveten bu kısımlar eklem işlevi esnasında kıkırdak dokuda görülen şekil değişiklikleri ile ilgili mekanik uyarıların kondrosite iletilmesinde de görevlidirler. Matrikse mekanik özelliklerini kazandıran ise interteritoryal matrikstir (18). Perisellüler matriks, kondrositin etrafını çevirerek ince bir kat meydana getiren kısımdır ve hücrenin etrafı ile uyarı iletimini ayarlayan kısımdır (9). Bu kısımda Prostaglandinler, ankorin CII gibi nonkollajen proteinler ve tip VI kollajen bulunurken tuhaf bir şekilde bu kısımda fibriller halinde kollajen çok çok azdır (9,18). Kondrositlerin sitoplazmik bağlantıları perisellüler matriks boyunca devam ederek teritoryal matrikse erişir (18).

Teritoryal matriks, perisellüler matriksi saran, ince kollajen lifler bulunduran ve yüklenme esnasında kondrositi mekanik olarak destekleyen kısımdır (9). Kondrosit ile etrafındaki teritoryal matriks ve perisellüler matrikse kondron denir (9,12). Teritoryal matriks bazı kısımlarda birden fazla kondrosit ve perisellüler matriksi kuşatırken, derin katmanda kondrositlerin meydana getirdiği kolonları kuşatır. Teritoryal matriksin hücreye yakın taraflarında kollajen lifleri perisellüler matrikse bağlanırken, daha uzak taraflarda fibriller birbirleri ile kesişirler ve hücreyi dış kısmından sarıp koruyan bir çeşit tabaka meydana getirirler. Bu bölümdeki kollajen fibrillerinin kalınlığı arttıkça ve birbirlerine paralel bir hale

gelmeye başladıkça interteritoryal matrikse geçiş başlar; fakat bu geçiş çok keskin bir şekilde kendisini belli etmez (18). Ekstrasellüler matriksin en büyük kısmı interteritoryal matrikstir ve ekstrasellüler matriksin mekanik özellikleri üzerinde en çok pay sahibi olan kısımdır. Eklem kıkırdak katmanlarında daha önceden söz edilen kollajen liflerinin farklı yönlerde sıralanması işte bu bölümde olmaktadır. Bu nedenle interteritoryal matriks, farklı kıkırdak katmanlarında farklı organize olur bu da her bir kıkırdak katmanının değişik biyomekanik özellikte olmasına neden olur (9).

2.4.3.KOLLAJEN

Kollajen, kıkırdakın şeklini korumada ve tensil kuvvetini sağlamada görev alır. Ayrıca diğer yapısal makromoleküller olan proteoglikanlar ve glikoproteinler, kollajen yapının üzerine tutunurlar. Böylece kollajen, eklem kıkırdakına kuvvet uygulandığında proteoglikan akışına karşı koyar (28). Eklem kıkırdakı 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, “ $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ ” 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 $\alpha 1$ protokollajen içeren Tip II kollajendir. Eklem kıkırdakında bulunan kollajenin %90-95’i Tip II kollajendir. Bunun yanında az miktarda Tip VI, IX ve XI kollajen bulunur. Tip VI kollajen kondrositlerin çevresini saran matrikste yoğundur ve hücrelerin matrikse yapışmasını sağlar. Tip IX ise proteoglikan parça içeren kısa bir kollajen liftir. Tip II ile çapraz bağlar oluşturur ve hücre dışı matrikste proteoglikan parçalar ile etkileşir Tip IV kollejen normal eklem kıkırdakında az bulunur ancak osteoartrit’in erken döneminde belirgin artış gösterir. Tip X kollajen kıkırdakın kalsifikasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Tip XI kollajen ise kollajen örgüsünü bir arada tutar. Fizyolojik koşullarda kollajen liflerinin metabolizması yavaştır ve liflerin yarı ömrü yıllarla ölçülür.(28, 29)

2.4.4.PROTEOGLİKANLAR

Kondrositler tarafından sentez edilip matrikse salınırlar. Proteoglikanlar ekirdek proteinlere kovalan olarak bağlanmış kondroitin 4 sülfat, kondroitin 6 sülfat ve keratan sülfat zincirlerinden oluşur. Bu zincirlerde birçok negatif yüklü sülfat ve karboksilaz bulunduğundan matriksteki suyu ve içindeki pozitif yüklü iyonları ekerler, negatif yüklü kondroitin sülfat ve keratan sülfat zincirleri ise birbirlerini iterler (30-32). Böylece proteoglikanların kollajen ağı içinde hapsolması sağlanmış olur ki bu da kıkırdakın üstün biyomekanik özelliklerinin ortaya çıkmasında büyük rol oynar (30). Proteoglikanlar eklem kıkırdakında kollajene bağlı veya kollajen ağları arasında hapsolm şekilde bulunabildikleri gibi, bağlayıcı bir protein vasıtasıyla hyaluronik asite bağlanmış yüzlerce kondroitin ve keratan sülfattan oluşmuş proteoglikan agregatı şeklinde de bulunabilirler (30). Bu ana bileşenlerin dışında eklem kıkırdakında farklı görevleri olan ve henüz görevi anlaşılamamış birçok değişik madde bulunur. Bir glikoprotein olan fibronektin yapışmada görev alırken, kondrokalsin kalsiyum bağlanması, kemik morfogenezik proteinler ise büyüme faktörü olarak görev alırlar (31). Matrikste birçok proteaz ve hyaluronidaz bulunur. Bunlardan lizozim enzimi kıkırdakı giren mikroorganizmalara karşı görev alırken, matriksin yapımı ile yıkımı arasındaki dengeyi sağlayan matriks metalloproteazların (MMP) en bilinenleri MMP-3, MMP-8, MMP-9 ve MMP-13’tür (31).

2.4.5.HYALURONİK ASİT

Sinoviyada bulunan B tipi sinovisitler tarafından sentezlenen hyaluronik asit polisakkarit yapıdadır. Synoviyal sıvıda 2-3 mg/ml miktarında bulunur (33). Eklemlerde

normal olarak kıkırdak tabakası üzerinde hyaluronik asitin meydana getirdiği düzensiz yapıda bir katman bulunmaktadır. Bu tabaka eklem içindeki yıkıcı yapıya sahip organik bileşenlere ve lizozomal enzimlere karşı duvar görevindedir. Ayrıca kıkırdak dokuda sentezlenip hücre arası matrikslerden eklem boşluğa sızmaya çalışan proteinler, proteoglikanlar ve metabolik bileşiklerin geçişine engel olur (34). Koruyucu olan katmanın inflamatuvar süreçte, inflamasyon hücreleri, salınan sitokin ve kemokinler veya litik enzimler hasar görmesi sonucunda kıkırdak lezyonları oluşur ve dejeneratif süreç başlar. Serbest hale gelen hyaluronik asit bileşenleri serbest hale geçerek eklem boşluğu içine düşer (35). Hyaluronik asit vücutta normal yoğunluk ve miktarda bulunduğu zaman, myoblastların differansiasyonunu inhibe ederek inflamasyonu engellerken, kondroblastların proliferasyonunu stimule eder. Ayrıca kondroprotektif özelliğini kıkırdak dokuda lezyon meydana gelip serbest fragmanter hale geçtiğinde başlatmaktadır (34).

2.5.KIKIRDAK LEZYONLARI

Eklem kıkırdak dokusunun içeriği direk travmayla birlikte menisküs lezyonları, dizilim bozuklukları, çevredeki osteokondral defektler, instabilite, akromegali, romatolojik hastalıklar, Paget hastalığı, hemofili, vasküler ve kıkırdak tümörler gibi travmatik olmayan ya da dolaylı bir biçimde travma ile ilişkili sebeplere bağlı olarak bozulabilir. Kıkırdak dokusunda görülen yaralanmalara karşı oluşturulan yanıt çoğu zaman dokunun onarımı için yetersiz kalmaktadır. Buna karşın kıkırdak dokusu, travmanın sertliğine ve meydana gelen lezyonun derinliğine göre çeşitli tepkiler verir (19,21,36).

Kıkırdak lezyonlarında öncelikle meydana gelen değişiklik ilerleyici şekilde meydana gelen kıkırdak erezyonudur. Primer olarak yük taşıyan ya da basınç altında kalan eklem kıkırdak dokusunun harabiyetidir. Mekanik bası olmayan bölgelerde de zaman içerisinde dejeneratif olarak lezyonlar meydana gelmektedir (37, 38).

Kıkırdak doku hasarlarında kondrositlerin metabolizmasında ve sentezlerinde artış gözlenmektedir. Fakat eş zamanlı olarak lizozomal enzimlerin sentez ve aktivitesinde de yükselme olmaktadır. Meydana gelen mekanizma sonucunda proteoglikanlarda, hyaluronik asitte ve kollajen miktarlarında azalma, fonksiyonel olarak da gerileme görülür. Kaskada dahil olan inflamatuvar hücreler nedeniyle ilerleme gösteren kıkırdak yüzey bozulması meydana gelir. Hyaluronik asitin molekül ağırlığı enzimatik reaksiyonlar nedeniyle azalarak eklem kazandırdığı elastikiyet ve kayganlaştırıcı etkisi azalır. Synovial sıvının basınç emici özelliği, eklem yüzlerini yağlayıcı özelliği kaybolur. Meydana gelen dejenerasyon ve kıkırdak dokunun beslenmesinin bozulması, hyalin kıkırdağın elastik ve dinamik fonksiyonunun kaybına, kıkırdak dokunun yük taşıma ve yükü aktarma kapasitesinde kayıplara neden olur (39-41).

2.6.KIKIRDAK İYİLEŞMESİ

Kıkırdak doku genel olarak çok kısıtlı bir iyileşme kapasitesine sahiptir. Bunun nedenleri avasküler olması, lenfatik ve sinir hücresi içermemesi, düşük hücre sayısına ve düşük metabolizma hızına sahip olmasıdır. Hyalin kıkırdak iyileşirken kondroblastlara ihtiyaç duyar. Kıkırdak hasarı geliştiğinde perikondriumda, subkondrol zonda bulunan kondroblastların lezyona doğru proliferasyon olarak değişim göstermesi gerekmektedir. Kondroblastlar, kondrositlere dönüşerek derin kıkırdak doku lezyonlarına ulaşmayı hedefler. Eklem hattına veya subkondral hatta ulaşan lezyonlar hemen fibrotik doku ile kapatılır. Bu da kıkırdak dokunun fonksiyonlarında eksiklik nedenidir. Kıkırdak doku iki mekanizma ile iyileşme sağlamaktadır (42,44).

1.İntrensek mekanizma: Kondrositlerin çoğalmasıyla ara madde ve oluşan doku boşlukları gerçek hyalin kıkırdakla doldurulur. Primer iyileşmedir; ancak lezyonun küçük ve etrafı sınırlı olduğu durumlarda gerçekleşir.

2.Ekstrensek mekanizma: Eklem hattına ve/veya subkondral katmana ulaşan lezyonlarda devreye giren mekanizmadır. Temel iyileşme tabanı hematoma dayanır. Hematom tıkaçların yerini fibrotik dokular alarak lezyonu kapatır. Ancak fonksiyonel kayıp meydana gelir.

Kıkırdak dokunun iyileşmesindeki sınırlayıcı faktörler nedeniyle lezyonun çapı arttıkça kıkırdak doku dolayısıyla eklemde fonksiyonel kayıp artmaktadır (41,43,44)

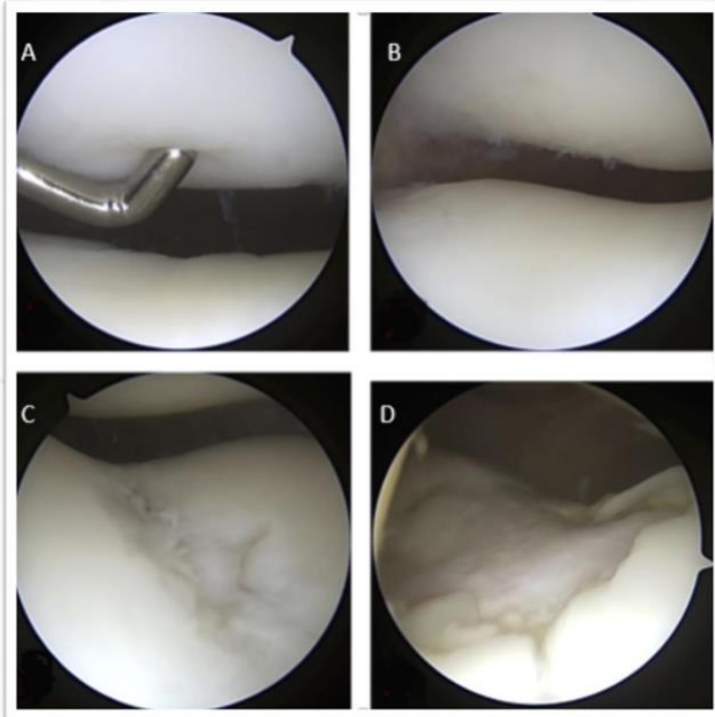
2.7. KIKIRDAK LEZYONLARINDA SINIFLAMA

1961 yılında kıkırdak lezyonları Outerbridge tarafından makroskopik olarak sınıflandırıldı. Sayısal bir sisteme dayanan sınıflama ilerleyen dönemde kıkırdak lezyonlarının artroskopik sınıflandırılmasında kullanılmıştır (45).

Outerbridge sınıflaması en sık kullanılan sınıflandırmalardan biridir. Kıkırdak hasarının derinliğini temel alır. Outerbridge sınıflamasının dezavantajı lezyonun derinliğini ve boyutlarını tanımlamamasıdır.

Tablo 1 Outerbridge Sınıflaması

Evre 1	Eklem yüzü şişmiş, yumuşamış ve kabarmış
Evre 2	Çapı 1 cm'den az olan fissürler ve yarıklar
Evre 3	Çapı 1 cm'den büyük, subkondral kemiğe kadar uzanan fissürler
Evre 4	Subkondral kemik açıkta



Şekil 2; Kıkırdak lezyonlarının artroskopik görüntüsü

Eklem kıkırdak lezyonlarının artroskopik olarak evrelendirilmesinde evrensel bir dil oluşturmak üzere 1997 yılında International Cartilage Repair Society (ICRS) tarafından standart bir evreleme sistemi geliştirilmiştir. Bu sınıflamada kıkırdak defektleri lezyonun derinliğini dikkate alarak 4 evre de sınıflandırılır. ICRS sınıflama sistemi kıkırdak lezyonun derinliğini, lokalizasyonunu ve yüzeyin durumunu tanımlamasının yanı sıra subkondral kemik tutulumunun önemini de vurgular (46).

Tablo 2:Uluslararası kıkırdak araştırma derneği artiküler kıkırdak yaralanmaları evreleme sistemi

Evre 0	Normal	
Evre I	Normale yakın	
	IA	Yüzeyel lezyon
	IB	Yüzeyel çatlaklar, yarıklar
Evre II	Anormal- % 50'den daha az derinlikte	
Evre III	Şiddetli anormal- % 50'den daha fazla derinliğe inen lezyonlar	
	IIIA IIIB	Kalsifiye kıkırdağa kadar Subkondral kemiğe kadar
Evre IV	Şiddetli anormal – subkondral kemik açıkta	

Kıkırdak lezyonlarını sadece büyüklük çapına göre değerlendirmek yetersiz olacaktır, lezyonun derinliği de önem taşımaktadır. Özellikle tidemarkı geçen, subkondral kemik bölgesine uzanan defektler iyileşme potansiyelleri açısından farklılık göstermektedir. Tidemarkı geçip kemik iliğine ulaşan lezyonlarda mezenkimal kök hücrelerin iyileşmeye yardımcı olduğu düşünülmektedir. Ancak meydana gelen iyileşme dokusu, rejenerasyon özelliği kısıtlı olduğundan dolayı primer kıkırdak doku kadar fonksiyonel olmamaktadır.

2.8.KIKIRDAK LEZYON TEDAVİ SEÇENEKLERİ

İdeal kıkırdak yaralanması tedavisi çevresiyle tamamen entegre, mekanik olarak işlevsel ve defekt alanında hiyalin kıkırdak oluşumu ile sonuçlanmalıdır. Biyolojik olarak kabul edilebilir tamirde, kıkırdak dokusu; defekti kıkırdak benzeri aramaddeyle doldurmuş, eklem yüzey konturunu sağlamış, sağlam çevre kıkırdak ile birleşmiş ve yük taşımaya uygun şekilde sert olmalıdır. Bilinen tedavi yöntemleriyle hiyalin kıkırdak elde etmek mümkün değildir. Çoğu zaman iyileşme dokusu karışık bir histolojiye sahip olmakta ve doku içerisinde birden fazla

kıkırdak tipine rastlanmaktadır. İdeali artiküler kıkırdak elde etmektir. Artiküler kıkırdak hiyalin kıkırdağın kolonlar şeklinde hücre dizilimi ve derinlerde radyal, yüzeyde paralel organize olmuş kollajen liflerinden oluşan ve bir tidemark ile kalsifiye kıkırdak ve dolayısı ile subkondral kemiğe bağlı şeklindedir. Yani hiyalin kıkırdak ile içeriği aynı olmakla birlikte organizasyon farkı içermektedir, ancak tamir yöntemleri ile bunu elde etmek zordur. Hiyalin kıkırdak tip II kollajen ve proteoglikan aramadde sentezleyerek salgılayan kondrositlerden oluşur. Fibröz kıkırdakta ise hem kondrosit hem de fibroblast bulunur. Bu nedenle ara madde ağırlıklı tip I kollajenden oluşur. Fibröz doku ise fibroblastlardan oluşur ve tip I kollajen ağırlıklı aramaddeye sahiptir. Bu kıkırdakların yük altındaki dayanıklılıkları da yukarıdaki sıraya göre düşmektedir .

Kıkırdak hasarı olan hastalara uygulanan konservatif tedavi yöntemleri (fizyoterapi, oral veya intraartiküler farmakolojik ajanlar) sadece şişlik ve ağrı gibi semptomların kısa süreli geriletilmesini sağlarlar; ancak kıkırdak dokunun dejenerasyon hızını yavaşlatsalar da oluşmuş kıkırdak yaralanmalarının iyileşmesini sağlayamazlar (47). Genç ve orta yaşlı bireylerde; kıkırdak lezyonlarının, ilerleyen dönemde osteoartrit ile ilerlememesi ve erken dönemde tedavi edilebilmesi için çeşitli tedavi yöntemleri üzerinde araştırmalar sürmektedir. Genç hastalarda kıkırdak yaralanmalarına yönelik uygulanan veya araştırılan yeni cerrahi tedavi yöntemlerinin hepsinin ortak amacı, kıkırdaktaki defektlerin yapısal ve fonksiyonel olarak normal kıkırdağa yakın bir yapı ile doldurulması ve bu yapının uzun süre dayanıklı olmasıdır; yani kıkırdak yüzeyin restorasyonudur(36,47).

Kıkırdak lezyonlarının tedavisinde kullanılan pek çok cerrahi teknik, tam kat gelişen lezyonlar sonrasında eklem kıkırdağının kendiliğinden iyileşme mekanizması üzerinden hareket eder(36). Hangi tedavinin uygulanacağına; lezyonun büyüklüğü, yeri, alt ekstremitenin dizilimi, kişinin yaşı, cinsiyet, vücut kitle indeksi ve hastanın fiziksel kapasitesi göz önüne alınarak tedavi yöntemi seçilir. Kıkırdak defektlerinin tedavisi için kullanılan güncel tedavi yöntemleri arasında: artroskopik debridman, abrazyon artroplastisi, subkondral kemiğe penetrasyon, mikrokırık, nanokırık, osteokondral otoplastik transferi, osteotomi, yumuşak doku greftleri, hücre transplantasyonu, büyüme faktörleri ve yapay matriks kullanımı gibi birçok teknik tanımlanmıştır. Gelişen doku mühendisliği ve teknoloji ile yeni kıkırdak oluşturma yeteneğine sahip dokular veya hücreler ile de eklem kıkırdak yüzeyinin rejenerasyonunu sağlanmaya çalışılmaktadır (48,49).

2.8.1.ARTROSKOPİK DEBRİDMAN

Eklem debridmanı ilk olarak Magnuson tarafından tanımlanmıştır (50) . Eklem debridmanı, osteofit temizliği, sinovektomi, menisektomiye içeren geniş bir terimdir. Tüm bu yöntemlerin kondral defektlere etkisini ölçmek zordur. Debridman ve lavaj, semptomları az olan, 2 cm² den küçük kıkırdak lezyonu olan düşük aktiviteli, hastalarda uygulanan palyatif bir yöntemdir. Dejeneratif eklem kıkırdak defektlerinde, semptoma yönelik ve geçici etkili bir yöntemdir. Kollajen ve proteoglikan gibi bozulmuş olan kıkırdak komponentleri, inflamasyona sebep olarak, kronik sinovit tablosuna neden olur. Bunların eklemde uzaklaştırılması geçici bir süre ağrının gerilemesini sağlar. Eklemde bol miktarda sıvıyla yıkanması, defekt bölgesinde yer alan gevşek süperfisyel kıkırdak dokunun alınması prensibine dayanır (51). Bu tür tedavilerin sonuçları kondral defektin büyüklüğü, sayısı ve dejenerasyonundan etkilenir. Klinik uygulamada artroskopik debridman, mikrokırık gibi kemik iliği stimülasyon yöntemlerinin bir parçası olarak görülür .

2.8.2.KEMİK İLİĞİ SİTÜMULASYON YÖNTEMLERİ

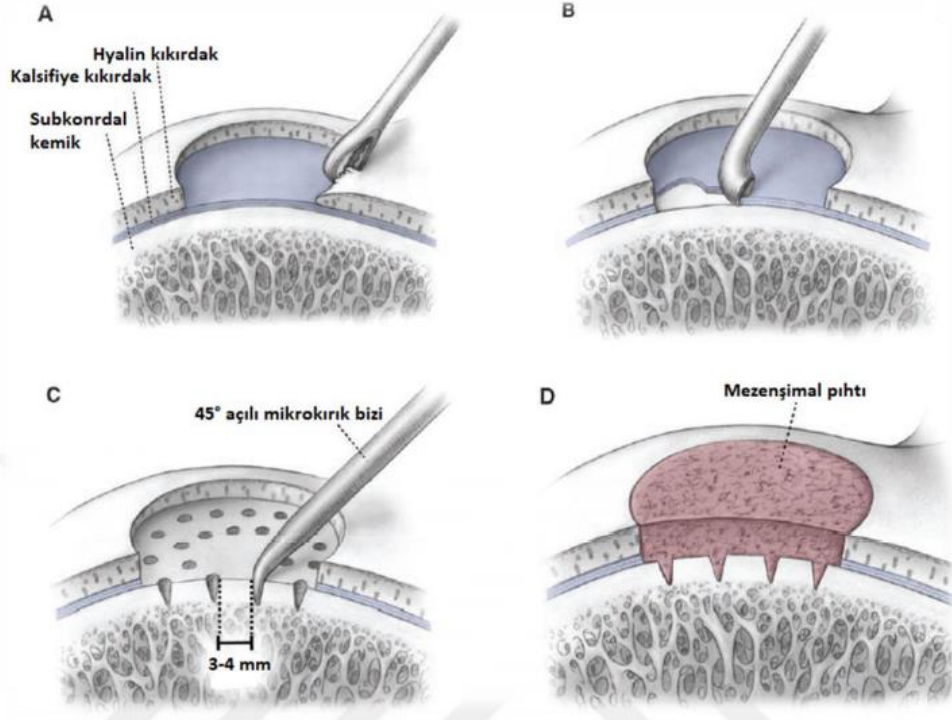
Bu tedavi yöntemlerinde amaç hücre göçünü ve kırık onarımı için sitokin üretimini sağlamaktır (52) . Pridie'nin delme yönteminin bir modifikasyonu olan mikrokırık, basit bir artroskopidir ve semptomatik kondral defektler için birinci basamak tedavi olarak kullanılan en yaygın yöntemdir (53). Ortopedik cerrahide hızlı ve ucuz olmasından dolayı sık kullanılan bir yöntemdir . Bu yöntemlerde kırık lifli doku veya tip I kollajen içeren fibrokartilaj doku ile onarılır çünkü kondroprogenitor hücre sayısı doku rejenerasyonunu elde etmek için çok azdır ve yavaştır buda daha sonra dejenerasyonlara yol açabilir (54).

Mikrokırık yöntemi 1997 yılında Steadman ve ark. tarafından tanımlanmıştır. Kolay uygulanabilmesi, ucuz olması, ek hazırlık gerektirmemesi ve diğer girişimlerin ileri uygulamalarını engellememesi nedeniyle kısa zamanda geniş kullanım alanı bulmuştur (55). Temelde delme yöntemi ile aynı olmakla birlikte ısı üretmediğinden çevredeki hücelere zarar vermez. Mikrokırık başarısız olsa dahi daha ileri tedaviler engellenmez, yani mikrokırık geri dönüşümsüz değildir. Kırık yaralanması olan bölge üzerinde kalan kırık, iyileşme dokusunun oluşumunu engelleyici özelliğe sahiptir. Bu nedenle her türlü onarım girişiminden önce debride edilmesi gereklidir (56,57).

Yöntemin başarı şansını artırabilmek için sağlam kırık defekt etrafında subkondral kemiğe dik açılı bir çerçeve oluşturacak şekilde hazırlanması gereklidir. Bu şekilde bir hazırlık iyileşme dokusunu basıdan ve makaslama kuvvetlerinden korurken fibrin pıhtının tutunmasına uygun ortam hazırlamaktadır (58).

Defekt kenarlarından başlayarak, sağlam kırığa yakın bölgede kırığın hemen yanına mikrokırık bizi ile subkondral kemiğe dik olacak şekilde delikler açılır. Mikrokırık bizin konik şekilde olması sayesinde girilen derinlik kontrol edilebilmekte ve cihazı delikten çıkartmak kolay olabilmektedir. Mikrokırık bizi, defekte dik olarak uygulanmalıdır. Bunu sağlamak amacıyla 30, 45 ve 90 derece eğimli bizi vardır.

Mikrokırık oluşturma işlemi sırasında çekiç kullanılır ve deliklerin birbirlerine mümkün olduğu kadar yakın olması sağlanır. Çevreden başlayarak defekt ortasına doğru ilerlenir. Delikler 3-4 mm aralıklarla açılır ve aralarındaki duvarın kırılarak birleşmesinden kaçınılır. Deliklerin birleşmesi subkondral kemik plağının biyomekanik desteğini bozabilir. Yetersiz delik yoğunluğu, oluşacak olan kırığın kalitesini ve defekti doldurma miktarını etkiler . Derinlikleri 3-4 mm olmalıdır. Açılan deliklerden yağ damlacıklarının çıktığı gözlemlendiğinde yani 3-4 mm inildiğinde yeterli derinliğe ulaşılmış demektir (59-61).



Şekil 3: Mikrokirik şematik cerrahi görüntüsü

2.8.3.OSTEOKONDRAL OTOLOG TRANSFERİ (MOZAIKPLASTİ)

Osteokondral Ototog Transferi ilk olarak 1993 yılında tanımlanmıştır (62). 1991 yılında hayvan deneyleri yapılmış bunu izleyen süreçte 1992 yılında standart klinik cerrahi ekipmanlar geliştirilmiştir. 1997 yılındaki klinik sonuçlara ait ilk yayınlar yayınlanmıştır. Küçük osteokondral greftlerin eklem içine dizildiği mozaikplasti yöntemi ise 1996 yılında yayınlanmıştır (63, 64).

Hyalin kıkırdak elde etmekteki güçlükler osteokondral otogreft ve allogreftlerin geliştirilmesine yol açmıştır. Bu yöntemde kemiğin kemiğe kaynaması nedeniyle kıkırdak iyileşmesindeki zorluklar minimize edilmiştir. Yeri değiştirilmiş hyalin kıkırdağın en önemli avantajı sağlam bir tidemark ve subkondral kemik ile beraber transfer edilmiş olmasıdır. Mozaikplastide greftler arası boşluklar dışsal dokular ve matriks ile dolar. Mozaikplastideki kıkırdağın büyük bir kısmını artiküler kıkırdak oluştururken boşluklar arasındaki küçük kısımları fibrözartilaj oluşturur (65, 66) .

Defekt derinliğinin 1 cm den büyük olduğu kemik defektinin eşlik ettiği durumlarda ilk tercih tedavi yöntemidir (67).



Resim 1: Mozaikplasti uygulanmış femur kondil kıkırdak lezyonu

OOT için defekt derinliği kıkırdak kalınlığının en az %50 si olmalıdır ve 2-6 cm² defekler için uygulanabilir (68). ICRS ye göre mozaikplasti için defekt çapı alt sınırı 1 cm iken klinik uygulamalarda 2 cm den küçük defeklere donör saha problemlerinden kaçınmak için uygulanır. Tek, tam kalınlık ve çapı 1-2.5 cm arasındaki kıkırdak defektleri artroskopik osteokondral greftleme ile tedavi edilebilir (69, 70).

Özetle, 50 yaşın altındaki hastalarda eklemlerin ağırlık taşıyan yüzeylerinin odaksal kondral ve osteokondral yaralanmalarında, instabilite, dizilim bozukluğu, menisküs ve bağ yaralanmalarının eş zamanlı tedavisi ile birlikte OOT endikasyonu vardır. Üç cm² den büyük, sağlam kıkırdak ile çevrili olmayan, 1 cm den derin defektlerde osteokondral taze ya da taze donmuş allogreft kullanılma endikasyonu da vardır (71).

Mozaikplasti Hangody ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Artroskopik, açık, miniartrotomi şeklinde uygulanabilir. Teknikler arasında çok fazla farklılık mevcut değildir. Dört, altı parçadan az defekt çapının 2cm den küçük olduğu durumlarda artroskopik teknik kullanılabilir. Artroskopik olarak alınabilecek en büyük greftler 6 mm boyutundadır. Altı mm daha büyük greftler patella ile donör saha arasındaki teması artırır ve artrotomi gerektirir. Femoral kondilin anteriorundaki lezyonların artroskopik tamiri mümkünken, posteriordaki defektler artrotomi gerektirebilir. Tibiada ye r alan ve patello femoral bölge defektleri için açık yöntem önerilir (72, 73).

2.8.4.MİKROKIRIK VE MATRİKS

Matriksler kök hücreleri içinde tutarak eklem içine kaçışları önlemektedir. Matriks uygulamasının periost greft uygulamasından daha başarılı olduğu gösterilmiştir. Bu yöntem

ACI ve MACI'nın aksine artroskopik olarak tek seansta uygulanabilmektedir. Bu yöntem 2 cm² den büyük lezyonlara mikrokirik uygulanmasında sağlar. Matriks ile kapama iyileşme dokusunda oluşan hipertrofiye engellemektedir. Bu özelliklerinden dolayı ACI ve MACI ye alternatif olarak bile önerilmektedir (74).

Matriks olarak sodyum hyaluronan kaplı eriyebilen polimer keçe, tip I ve III çift katmanlı kollajen membran ya da chitosan-gliserolfosfat implantlar kullanılmıştır. Hyaluronan'nın mezenkimal kök hücrelerinin kondrosite farklılaşmasında olumlu etkisi gösterilmiştir. Deneyisel çalışmalarda chitosan gliserol ve fosfat implantlarının iyileşme dokusunda daha çok proteoglikan ve tip II kollajen içerdiğinden hiyaline yakın bir kıkırdak dokusu oluşturduğu düşünülmektedir (74, 75).

2.8.5.OTOLOG KONDROSİT İMPLANTASYONU

Chesterman ve Smith 1968 yılında kondrositleri ilk defa izole ederek kültürde sayılarını arttırarak üretim yapmışlardır(76). 1971 yılında Bentley ve Greer kondrositleri izole ederek kartilaj doku hasarlarında tedavi amaçlı kullanmışlardır (77). OKİ 1997 yılında Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Kurumu (U.S. Food and Drug Administration, FDA) onayı almıştır, bu tarihten başlayarak 11 yıllık sonuçlarını yayınlayan Peterson sayesinde teknik ön plana çıkarılmış ve yaygınlaşmıştır (78).

Diz eklemine yük taşımayan bir bölgesinden küçük bir kıkırdak parçası alınır. Kondrositler özel bir doku kültürü laboratuvarında enzimatik olarak izole edilir. Hücreler daha çok sayıda milyonlarca aktif kondrosit üretmek için in vitro şartlarda çoğaltılır. 2-3 hafta sonra eklem açılır kondral defekt tibia yüzeyinden alınan periosteal doku ile kaplanır. Daha sonra in vitro şartlarda üretilen kondrosit süspansiyonu periosteal yamanın altına enjekte edilir.

Otolog kondrosit implantasyonunun avantajları allojenik greft kullanılmaması, ölü boşluklar kalmaması, greft alınan saha hasarı olmamasıdır. Dezavantajları ise iki ayrı cerrahi uygulama gerektirmesi, yüksek maliyetli olması, kondrosit çoğaltılması ve kıkırdak doku oluşmasının süre alması ve transport işlemleri gerektirmesidir(79).

Otolog kondrosit implantasyonu yöntemini takiben yapılan histolojik çalışmalarda oluşan kıkırdağın hiyalin ya da hiyaline benzer yapıda olduğu bildirilmiştir. Kıkırdağın bir kısmında fibrokartilajdan oluşmaktadır fakat bu fibrokartilaj kalite olarak yüksek seviyede olduğu bildirilmiştir (80). Komplikasyon olarak %3,8 insidans vardır, en sık görülen ise yeni kartilaj dokuda hipertrofi meydana gelmesidir(81). Bunun dışında implante kartilajın çevre doku ile uyumsuzluğu, yetersiz yeni doku oluşumu, subkondral kemik ile greftin ayrılmasıdır(82). OKİ uygulanan hastaların sekonder cerrahi geçirme oranları yüksektir. Ancak bu oranın yaş ile veya defektin büyüklüğü ile ilgisi yoktur. En sık neden hipertrofik greft olmuştur(83). Greft altındaki periostun sürtünme ile uyarılması hipertrofiye neden olmaktadır. Patelladaki vertikal kuvvetlerin augmentasyon üzerinde etkili olduğu düşünülür ki en az yetmezliğe gidiş bu bölgede görülmektedir.

2.8.6.MATRİKS DESTEKLİ OTOLOG KONDROSİT İMPLANTASYONU

Otolog Kondrosit İmplantasyonu hassas bir hücre süspansiyonu kullanmak, periostu su geçirmez bir şekilde kapatmak ve bu nedenle kıkırdığa dikiş geçirmek gerekir. İkinci seansta artrotomi yapmak gerekir ki artrotomi ve periost grefti kullanımı komplikasyonlara açıktır. Standart tek katman hücre kültüründe kondrositler fenotipik olarak farklılaşmaya zorlanmaktadır. Hücre süspansiyonu enjeksiyonu, homojen olmayan dağılıma ve periost greftinden sızarak hücre kaybına neden olmaktadır, ayrıca cerrahi süreside uzundur. Tüm bu sebeplerden dolayı çözüm amaçlı 1999 yılında MACI geliştirilmiştir. 2002 yılından itibaren ACI'nın ikinci nesli olan biyobozunur üç boyutlu matrikslerin kullanıldığı MACI geliştirildi (84-86).

Matriksler ve kıkırdak aramaddesi hücreleri, defekt içerisinde tutunmalarını ve işlevlerini sürdürmelerini destekleyecek yapısal çatılar oluşturmaktadır. Matriks olarak en sık kollajen ve hyaluronan temelli malzemeler kullanılmaktadır (86). Hücrelerin eşit dağılımını sağlamak için ilk olarak tip I ve tip III kollajenden oluşan membran kullanılmış, kondrositler bu membran üzerine ekilerek implante edilmiştir (87). Kollajen membrana ekilen hücrelerin, homojen dağılım gösterdikleri ve kondrosit fenotiplerini korudukları bildirilmiştir. Tip I kollajen fibroblastik hücre morfolojisini uyarmakta ve hücreleri bu yönde yönlendirerek fibröz aramaddede üretirmektedir. Tip II kollajen ise kondroblastik morfolojiyi uyarak GAG aramaddesini üretmeye yönlendirir. Bir matriksin por büyüklüğü azaldıkça (<50 mikrometre) sağlamlığı artar, ancak hücreleri daha çok fibroblastik morfolojiye yönlendirir (88).

Suni matriksler biyobozunur olmalı, biyouyumlu olmalı, uygun sürede bozunmalı ve hücre kolonizasyonuna izin vermelidir (89). Matriks rehberli otolog kondrosit implantasyonu cerrahi tekniğinin ilk aşaması ACI ile aynıdır. Yüz mililitre otolog kan ile birlikte 5x10 mm boyutunda kıkırdak doku alınarak laboratuvara gönderilir. Üç - dört hafta içerisinde otolog serum ve büyüme faktörleri de kullanılarak 15-20 milyon hücre üretilir. Domuz kaynaklı tip I/III iki katmanlı kollajen membranın her bir santimetrekaresi başına canlılığı %85'in üzerinde olan en az 1 milyon hücre ekilmelidir (90). Defekt ACI'da olduğu gibi hazırlanır. Kanama kontrolü yapılır. Alüminyum folyo yada eldiven kağıdı ile defektin şablonu çıkarılır. İmplant şablon şeklinde kesilir. İmplantı kesmek ve yerleştirmek için uygulanan manipülasyonun tutunmuş hücrelere zarar vermediği gösterilmiştir. Fibrin yapıştırıcı ile hücreli retiküler pürüzlü kısım subkondral kemiğe bakacak şekilde yapıştırılır. Üç dakika boyunca basınç uygulayarak yapışma beklenir. Gerekirse dikiş ile kuvvetlendirilebilir. Dize birkaç defa fleksiyon-ekstansiyon yaptırılarak implantın stabilitesi kontrol edilir (91, 92).

2.8.7.ALLOJENİK OSTEOKONDRAL VEYA KONDRAL GREFTLEME

Bu teknikte amaç, kıkırdak onarımını sağlama değil yaralanmanın olduğu bölgeye sağlam osteokondral greftin aktarılmasıdır. Greftler sıklıkla kadavradan alınmaktadır. Geniş osteonekrozlar, tümör rezeksiyonları, büyük travmalar ve çok ileri seviyedeki osteoartritli hastalarda bulunan büyük kemik ve eklem kıkırdak yaralanmalarında başarılı bir biçimde uygulanmasına rağmen immünolojik sorunlar, maliyetin yüksek olması, hastalık bulaşma olasılığı gibi dezavantajları bulunmaktadır (93).

Kıkırdak dokusu bağışıklık sisteminden soyutlanmış bir durumda bulunmasına karşın bu yöntemin immünsüpre bireylerde daha iyi sonuçlar verdiği belirtilmiştir. Fakat hâlâ bu işlemler öncesinde HLA testlerinin yapılmasına ihtiyaç duyulmamaktadır. İlk yapılan

uygulamalarda taze kadavradan elde edilen greft izotonik içerisinde muhafaza edilerek ilk bir hafta içinde uygulanabiliyordu. Daha sonra bu greftleri muhafaza etmek amacıyla kültür ortamları yapıldı ve bu vesileyle kondrosit canlılığı daha uzun zamanlar sağlanabiliyordu. Yeni bir osteokondral allogreftin iki haftadan fazla saklanması neticesinde kondrosit sayısının düştüğü, hücrelerin canlılığının ya da metabolik faaliyetlerinin azaldığı anlaşılmıştır. İlerleyen dönemde depolama koşullarının hafifletilmesi ve greftin elde edilmesini kolaylaştırmak adına donmuş greftler planlandı. Kadavradan alınan ve hemen kullanılmayarak dondurulan bu greftlerde, kondrositlerde özellikle yüzeyel katmanda ölüm görülmekte (kondrositlerin yalnızca %20-30'u canlı kalmaktadır) ve bu da yerleştirilen dokudaki kıkırdığın içeriğinin daha hızlı deforme olmasına ve mekanik açıdan zayıflamasına sebep olmaktadır.

Dondurularak bir kültür ortamında muhafaza edilen greftler ile birlikte taze dondurulmuş greftler de bulunmaktadır. Taze dondurulmuş greftlerin diğer dondurularak muhafaza edilen greftlere nazaran daha az immünolojik tepkilere ve daha az hastalık bulaşına sebep olduğu belirtilmiştir. Fakat taze dondurma yöntemiyle greftin bütün kondrositleri ölmektedir. Allogreftlerin kemik bölümleri ise giderek çok yavaş bir biçimde bireyin doğal kemik yapısıyla yer değiştirirken üzerinde bulunan kıkırdak için mekanik bir dayanak olmaktadır. Uzun dönem izlemlerde bu yöntemin %65-85 arasında başarı ile uygulandığı ve immünolojik tepkilerin insanlarda hayvanlara nazaran daha nadir görüldüğü belirtilmiştir.

Allogreftlerin uzun dönem canlılıklarının, yapılarındaki canlı kondrosit miktarına ve greftin mekanik sağlamlığına bağlı olduğu tahmin edilmektedir. (94, 95) Bu uygulamanın ayrıca osteokondral yaralanması olup diğer yenilenme tedavilerinin başarılı olmadığı ya da başarılı olamayacağı düşünülen hasta gruplarında yapılmasının uygun olacağı düşünülmektedir (95).

2.8.8.DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Son yıllarda giderek artan şekilde uygulama alanları bulan doku mühendisliği; biyolojik, kimyasal ve mühendislik prensipleri uygulanarak, biyomateryaller, hücreler ve biyolojik faktörler kullanılmasıyla yaşayan dokuların tamiri, restorasyonu ve yeniden oluşturulması olarak tanımlanabilir. 4 farklı şekilde kullanımı mevcuttur. Bunlar Otolog kondrosit implantasyonunda olduğu gibi kondrositlerin in-vitro kültür sonrasında transplantasyonu, defektif yere biyolojik faktörlerin yerleştirilmesi, nanoteknoloji kullanılarak yeni kıkırdak dokunun büyümesini stimüle eden üç boyutlu poröz skafoldların kullanımı ve son olarak skafold, hücreler ve büyüme faktörlerinin kombine kullanımıdır (96).

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. Elde edilen yapay kıkırdak normal eklem kıkırdakıyla aynı biyomekanik özelliklere sahip olmalıdır. Ancak bu şekilde eklem yüksek streslere maruz kaldığı ortamda normal fonksiyonunu sürdürebilir.

Kıkırdak doku mühendisliğindeki en önemli zorluklardan biriside eklem kıkırdak yapısının katmanlarında kondrositlerin fonksiyonel ve işlevsel özelliklerinin farklılık göstermesidir. Yüzeyel, orta ve derin katmanlardaki kondrositlerin metabolizmaları birbirinden

farklıdır(97). Örnek olarak süperfisyal tabaka kondrositleri yüzeyel bölge proteini sentezlerken orta katman kondrositleri ağırlıklı olarak tip 2 kollajen sentezlerler. Subkondral bölgeye doğru artan kollajen sentezi sayesinde derin tabaka daha dayanıklıdır. Bu farklılıklar nedeniyle doku mühendisliği tekniğinde katmanlara hücrelerel dağılım değışiklik göstermesi gerekmektedir. Tabakalar arası başarısızlık bu nedenden dolayı oluşmaktadır(98).

Bu homojen olmayan yapıyı taklit etmek ve ekleme binen yükü tolere edebilmek için farklı doku iskelelerinin kullanımı ön plana çıkmıştır. İyi bir skafold bozunmayı önleyebilmeli, hücre ölümünü kontrol altında tutabilmeli, besin geçişine ve artık biyomaddelerin difüzyonuna izin vermeli, kırık dokunun sağladığı doğal yapışma desteklerini sağlamalı, matriks oluşumunu destekleyebilmeli ve tabi ki hücre proliferasyonuna izin verebilmelidir (99).

Skafoldlar, doğal veya sentetik materyallerle imal edilebilir. Doğal polimer olarak kitosan, jelatin, fibrin, hiyaluronan ve aljinat kullanılır iken; sentetik polimer olarak polikaprolakton (PCL), poli-hidrosibutirik asit-ko-hidroksivaleik asit (PHBV), hidrojeller, desellülerize doku iskeleleri gibi yapı iskeleleri kullanılmaktadır. Hücre kaynakları arasında izole otolog kondrositler, kırılmış otolog kırık dokular, multipotent kök hücreler (örn, kemik iliğı, kas, sinoviyum veya adipoz türevli mezenchimal hücreler), pluripotent kök hücreler ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPSC) bulunur. Kondroindüktif büyüme faktörleri temel olarak transforming TGF- β süper ailesinin üyeleri, IGF-1 ve spesifik FGF familyasının üyelerinden oluşur. Bu büyüme faktörleri, hücre kültüründeki kök hücrelerin kondrojenik farklılaşmasını uyarmak veya kontrollü salıverilmesi, gen transdüksiyonu/dağıtımı veya nanoparçacık dağıtımı amacıyla kullanılmaktadır (100, 101).

3. EKSTRASELÜLER VEZİKÜLLER

Ekstrasellüler veziküller (EV) salgılandığı hücreye ait spesifik bilgi taşıyan ve hücrelerarası iletişimi sağlayan nanopartiküllerdir. İlk defa 1970' lerde Wolf tarafından plazmada gözlemlenmiş ve trombosit tozu olarak adlandırılmışlardır. EV'ler hücre dışı ortama salınan tüm membran veziküller için kullanılan genel bir terimdir. Bu veziküller işlevsellik, oluşum mekanizmaları ve biyofizyolojik açıdan farklı özellikteki birçok vezikül türünü içinde bulundurmaktadır (102-104).

Salıverilme mekanizmaları ve boyutlarına göre üç ana EV tipi tanımlanmıştır: eksozomlar (150 nm'den daha küçük çaplı), mikroveziküller/ektozomlar (100-1000nm) ve apoptotik cisimler (>1000nm). Mikroveziküller ve apoptotik cisimcikler sırasıyla canlı ve ölmekte olan hücrelerde doğrudan plazma zarından salınır. Eksozomlar, EV'lerin en küçük üyesidir. Diğer EV'lerden farkları; kargo içerikleri, lipid kompozisyonları ve kendilerine özgü biyogenez yollarıdır (105).

EV'ler, içerisinde mesajcı ribonükleik asitler (mRNAs) ve mikro ribonükleik asitler (miRNAs) dâhil olmak üzere çeşitli RNA türlerini, çözünür proteinleri ve transmembran proteinlerini barındıran lipid membranla çevrili yapılardır. EV'ler, prokaryot gibi organizmalardan yüksek ökaryotlara ve bitkilere kadar değışen hücreler tarafından evrimsel olarak salınmaktadır. Bu yapılar hücre içi iletişim, membran proteinlerinin ve lipidlerin geri dönüşümü, bağışıklık modülasyonu, anjiyogenez ve hücrelerel proliferasyon ve farklılaşma gibi birçok süreçte rol oynamaktadır(106, 107).

3.1.EKSTRASELLÜLER VEZİKÜLLERİN SINIFLANDIRILMASI

Hücreler, farklı oluşum mekanizmalarından dolayı farklı fizyolojik özelliklere, içeriğe ve fonksiyona sahip çeşitli veziküller salgılamaktadır. Bu yapılar mikroveziküller, apoptotik cisimcikler ve eksozomlardır (106).

3.1.1.MİKROVEZİKÜLLER

Hücre membranından tomurcuklanarak doğrudan hücre dışına salgılanan veziküllerdir. Bu sebeple, endozomal yol ile meydana gelen eksozomlara göre, mikroveziküller türedikleri hücrenin membran bileşimini daha iyi yansıtmaktadır. Mikroveziküllerin boyutları 50-1000 nm arasında değişir ve şekil açısından heterojen bir özellik gösterirler. Mikroveziküllerin, yapısında plazma membran lipidleri ve proteinleri, sitoplazmik lipidler, proteinler ve nükleik asitler bulunmaktadır. Mikroveziküller Ca^{2+} veya fosfolipid bağlayıcı proteinlerin aracılık ettiği hücre içi olayların bir uyarın tarafından (hipoksi, oksidatif stres veya kayma gerilimi) tetiklenmesiyle oluşmaktadır. Mikrovezikül oluşumunda kalpain, flippaz, floppaz, skramblaz ve gesolin gibi birçok enzim görev almaktadır (108).

3.1.2.APOPTOTİK CİSİMCİKLER

Nekroz ve apoptoz en önemli hücre ölüm mekanizmalarıdır. Her iki mekanizma da biyolojik uyarınlar tarafından aktive edilmektedir. Nekroz, mekanik hasar veya patojenik bir etki sonucu meydana gelirken, apoptoz programlanmış hücre ölümüdür. Apoptoz sırasında hücreler, toksik veya immünojenik olabilecek hücre içi içeriklerin ekstraselüler matrikse geçişini önlemek amacıyla apoptotik cisimcik adı verilen daha küçük yapılar oluşturmaktadır. Bu yapılar içerisinde DNA, RNA parçaları, histonlar ve organeller bulunabilir. Boyutları 50-5000 nm arasında değişen apoptotik cisimcikler, eksozom ve mikroveziküller gibi şekil açısından heterojen özellik gösterir. Hücrenin salgıladığı apoptotik cisimcikler fagositoz yoluyla makrofajlar tarafından yok edilmektedir..

3.1.3.EKSOZOMLAR

Hemen hemen tüm bakteriler, arke bakteriler ve ökaryotik hücreler, hücre dışı boşluğa nano boyutta membran vezikülleri salgılamaktadır (109). Bu hücre dışı veziküller çeşitli proteinler, nükleik asitler (DNA, mRNA, miRNA, lncRNA) ve lipidler içeren; sferik ve çift katmanlı proteolipit yapısındadır (109, 110). İlk başlarda uzun bir süre hücre dışı artıklar olarak değerlendirilmişlerdir fakat yapılan son çalışmalar EV'lerin çok yönlü fizyolojik ve patolojik fonksiyonlara sahip olduklarını göstermektedir. Hücreler arası iletişimde hatta türler arası veya canlı alemleri (inter-kingdom) arasında iletişimde rol aldıkları belirtilmektedir.

Eksozomların diğer EV'lere göre daha önemli olmasının nedeni, taşıdıkları RNA (miRNA, mRNA) kargolarıdır. Hücreler arası etkileşimde rol oynayan eksozomlar, taşıdıkları RNA'lar sayesinde alıcı hücreye aktarıldıklarında o hücrenin fonksiyonunu değiştirebilirler(111). EV'lerin farklı organizmalarda salgılanma mekanizmaları büyük benzerlikler içerdiğinden EV-aracılı hücreler arası haberleşmenin evrimsel olarak korunduğu bildirilmektedir (109). Son on yılda, EV'lerde paketlenmiş biyolojik bilgilerin hücreler arasında

aktarılabildiği ve alıcı hücrelerin fenotipini değiştirdiği gösterildikten sonra EV'lere olan bilimsel ilgi hızla artmıştır (110).

3.2.EKSOZOMLARIN BİYOGENEZİ, YAPISI VE İÇERİĞİ

Hücreler, moleküllerin hücre içine alınması ve salgılanması için oldukça karmaşık bir membran ağına sahiptir. Bu karmaşık yapı sayesinde hücreler hem endositoz ile dış ortamdan makromolekülleri hücre içine alabilmekte hem de ekzositoz yoluyla sentezlenen proteinleri ve karbonhidratları hücre dışına salgılayabilmektedir(112). Proteinlerin hücre dışına salgılanmasında farklı mekanizmalar kullanılabilir. Büyük biyomoleküllerin ekzositoz yoluyla hücre dışına salgılanması en yaygın mekanizmadır. Ayrıca, multiveziküler cisimciğin (MVB) plazma zarı ile birleşmesi sonucunda içeriğinin hücre dışına salımı da diğer ekzositoz mekanizmasını oluşturmaktadır. Hücre dışına salınan bu küçük membran veziküller endositik kökene sahip yapılar oldukları için bu mekanizma aynı zamanda endozomal sisteme ait bir salgılama işlemidir. Endositik veziküller, geç endozom, erken endozom ve lizozom endozomal sistemde yer alan diğer yapılarıdır (113). Endositik veziküller klatrin bağımlı ve klatrin bağımsız endositoz ile meydana gelir ve erken endozom ile birleşir. Geç endozom ise erken endozomun olgunlaşmasıyla meydana gelmektedir. Geç endozomdan MVB oluşumunda en önemli faktör geç endozomun plazma membranının içeri doğru bükülmesiyle tomurcuklanmasıdır. Eksozomların biyogenezi de endozomal sistem içerisinde başlamaktadır (114).

Eksozomlar herhangi bir hücresel organel içermeyen küçük bir sitozol oranına sahip, çift katlı lipit katmanıyla çevrilmiş endositik yollarla meydana gelmiş yapılardır (115). Endositoz sonucu oluşan endositik veziküller erken endozomla birleşerek geç endozoma olgunlaşmaktadır. Bu olgunlaşma süresince geç endozoma ait hücre zarının lümen içine doğru kıvrılmasıyla intraluminal vezikül olarak adlandırılan çok sayıda küçük membran veziküller oluşmaktadır. İçerisinde çok sayıda intraluminal vezikül barındıran bu yapı MVB olarak adlandırılmaktadır. Son adımda MVB hücre plazması ile birleşerek boyutları 30-150 nm arasında değişen intraluminal vezikülleri eksozom olarak hücre dışına salgılamaktadır (116). Ancak oluşan her MVB, içeriğini eksozom olarak dışarı salgılamamaktadır. MVB'nin plazma membranıyla birleşmek dışında izleyeceği farklı metabolik yollar da bulunmaktadır. Bu alternatif yollardan birisi MVB'lerin lizozomlarla birleşerek yapılarının parçalanması sonucu içeriklerinin hücreye geri dönüşümüdür. Diğer bir metabolik yol ise melanozomlar, azurofilik granülleri gibi özelleşmiş lizozom benzeri organellerin oluşumuna katkıda bulunmalarıdır (117). Yapılan çalışmalar MVB'nin oluştuktan sonra sahip olduğu kolesterol seviyesine bağlı olarak izleyeceği metabolik yolları belirlediğini göstermiştir. Kolesterol seviyesi düşük olan MVB'ler lizozoma doğru hedeflenirken, sadece kolesterol seviyesi yüksek olan MVB'ler plazma membranı ile birleşerek içeriklerini eksozom olarak dışarı salgılamaktadır(116, 117).

ESCRT (Taşınım için Gerekli Endozomal Ayırma Kompleks Proteinleri) mekanizması MVB oluşumunda merkezi bir rol oynamaktadır (116). ESCRT'ler 4 ana alt birimden (ESCRT-0,- I,-II,-III) ve yardımcı proteinlerden (AAA ATPase ve Vps4) oluşmaktadır (118). Taşınım için Gerekli Endozomal Ayırma Kompleks Proteinleri-0, ubiquitin proteinlerinin tanınmasında ve sıralanmasında görev almaktadır. ESCRT-I ve II plazma membranının lümen içerisine tomurcuklanmasını sağlarken, ESCRT-III vezikülün ayrılmasından sorumlu olmaktadır.

Birbirinden bağımsız yapılmış dört çalışmada HeLa ve HEK293 gibi çeşitli hücre hatlarında Hrs ve STAM proteinlerinin inhibisyonu sonucu eksozom salgısında azalma olduğu tespit edilmiştir. Çalışmalar ESCRT-0 kompleksinin bir alt birimi olan söz konusu bu proteinlerin eksozom salgılanmasında etkin bir rolü olduğunu göstermiştir (118).

Farklı hücrelerden salgılanan eksozomlarda yapılan proteomik analizler ESCRT-II ve ESCRT-III komplekslerine sahip alt birimlerin varlığını ortaya koymuştur. David ve ark., ESCRT-III kompleksiyle ilişkili bir protein olan ALIX'in endozomlarda veziküllerin lümen içerisine doğru tomurcuklanmasını tetiklediğini göstermiştir (119). Ancak çalışmalar ESCRT ailesine ait tüm alt gruplar inhibe edildiği takdirde, eksozom oluşumunun durmadığını ve devam ettiğini göstermiştir. Bu bulgular eksozom oluşumunda sadece ESCRT mekanizmasının aracı olmadığını, ESCRT kompleksinden bağımsız MVB oluşum mekanizmalarının da var olduğu fikrini ortaya çıkarmıştır.

ESCRT kompleksi olmadan gerçekleşen eksozom oluşumunda en basit sfingolipid olan seramid molekülleri etkili olmaktadır. Seramidler apoptoz ve hücrel stres sırasında nötr sfingomiyelinaz (nSMase), asit sfingomiyelinaz (aSMase) ya da novo sentezi etkisi ile meydana gelirler. Çalışmalarda nSMase inhibisyonu sonucu eksozom biyogenezinde azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu gözlemler MVB oluşumunda farklı biyogenez mekanizmalarının yer aldığını öne sürmektedir. Ancak, bu önerilen iki mekanizma arasındaki geçişi hangi sinyallerin kontrol ettiği tam olarak bilinmemektedir (120).

3.3.EKSOZOMLARIN MOLEKÜLER BİLEŞİMİ

Eksozom veritabanının en güncel verilerine göre, birçok farklı hücre türünden elde edilen eksozomlarda 41860 protein, 4946 mRNA, 2838 miRNA ve 1116 lipid türü tanımlanmıştır. Bu veriler eksozom içeriğinin oldukça karmaşık olduğunu göstermektedir (121).

Protein Bileşimi: Eksozomlar, rastgele dizilmiş bir protein içeriği yerine; sitozol, plazma membranı ve izlediği endositik yollardan kaynaklı belirli protein ailelerine ait spesifik protein türlerini içerir. Proteomik analizler eksozomlarda kollajen, integrin ve galaktin gibi ECM ve hücre yüzey proteinlerinin; epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) gibi hücre yüzey reseptörlerinin varlığını ortaya koymuştur (116, 122). Endozomal kaynaklı olmalarından dolayı eksozomların yapısında aneksin ve flotillin gibi protein taşınmasında görev alan ve membran füzyonu için önemli olan proteinler de yer almaktadır.

Eksozomlar, hedef hücrenin belirlenmesinde yer alan tetraspanin ve MVB'den eksozom biyogenezinde rol oynayan Alix ve TSG101 proteinlerini içermektedir (122, 123). Eksozomlarda, hücreler arası adezyon molekülü-I, CD 146, CD9, CD18, CD11a, CD11b, CD11c ve CD166 gibi birçok adezyon molekülleri yer almaktadır. Ek olarak eksozomlarda CD9, CD63, CD81 ve CD82 içeren tetraspaninler oldukça fazladır ve bu proteinler eksozomlara özgü hücre yüzey belirteçlerini oluşturmaktadır (116). Eksozomlarda Rab proteinlerini içeren sitozolik proteinler ise eksozomun füzyon olaylarını düzenlemektedir. Ek olarak, Hsp70 ve Hsp 90 ısı şok proteinleri ve GTPazlar eksozomlarda en sık görülen diğer proteinlerdir. Endozomal kaynaklı olmalarına rağmen, eksozomlar endoplazmik retikulum, mitokondri veya Golgi cisimciğine ait proteinleri içermezler (124, 125).

Lipid Bileşimi: Proteinlere benzer şekilde eksozom yapısında yer alan lipidler de eksozomların salgılandıkları ve köken aldığı hücrelere özgüdür (126). Eksozomlar daha çok kolestrol, digliserid ve sfingolipid ailesine ait seramid ve sfingomiyelin, fosfolipit ve fosfatidilkolin (PC), fosfatidilserin (PS), fosfatidiletanolamin (PE), fosfatidilinositol (PI) gibi gliserofosfolipidleri içermektedir. Fosfatidilserin flippaz, floppaz ve skramblaz enzimleri sayesinde dış membran proteinlere bağlanarak sinyal iletiminde ve membran füzyonunda görev almaktadır. Sfingomiyelin ise eksozomların sabit bir yapıda kalmalarını sağlarken aynı zamanda hücreler tarafından salınımı da kolaylaştırmaktadır (127). Bu lipitlere ek olarak eksozomlar prostaglandinler, lökotrienler gibi biyoaktif özellikteki lipidleri ve fosfolipaz C gibi lipid metabolizması içinde aktive olan enzimleri de bileşiminde bulundurmaktadır. Bu özellikleri sayesinde eksozomlar biyoaktif lipidlerin alıcı hücrelere aktarılmasını sağlayan lipid taşıyıcısı olarak görev alabilmektedir (128).

Nükleik Asit Bileşimi: Eksozomlarda mRNA ve miRNA'nın varlığı ilk defa 2007 yılında yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Yapılan bu önemli keşiften sonra fare ve insan hücresi kökenli eksozomlarda binlerce farklı mRNA türü tanımlanmıştır. Lötval ve ark. eksozomların yapısında yer alan mRNA'ların işlevsel özellikte olduklarını da belirtmişlerdir. Eksozomal mRNA'lar çoğunlukla hücre döngüsü, anjiyogenez ve histon modifikasyonlarında görev alan aktif yapılardır. In vitro çalışmalarda fare kaynaklı eksozomların RNA içeriklerini insan mast hücrelerine aktarabildiği ve alıcı hücrelerde fareye ait bu proteinlerin translasyonunun gerçekleştiği belirtilmiştir. Bu özellik eksozomların genetik bilgi aktarımını sağlayarak hücreler arası iletişimde oldukça önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir (129, 130).

3.4.EKSOZOMLARIN HEDEF HÜCREYE ALINMASI

Eksozomların hedef hücrelerini nasıl seçtikleri ve seçilen bu hücrelere içeriklerini nasıl aktarabildiği hala araştırılan bir konudur. Bu aşamada eksozomların hedef doku ve organlara ulaştıktan sonra her bir hücre tarafından hücre içine alınma mekanizmalarının anlaşılması oldukça önemlidir. Literatürde günümüze kadar yapılan çalışmalarda söz konusu bu mekanizmalar genel olarak üç ana başlık altında toplanmaktadır (131, 132).

Reseptör - Ligand Etkileşimleri: Bu mekanizma eksozomların plazma membranında bulunan transmembran proteinleri ile alıcı hücrelerin plazma membranında bulunan reseptörlerin doğrudan etkileşimiyle gerçekleşmektedir. Literatürde yapılan bazı çalışmalar eksozomların test edilen tüm hücreler tarafından alınabileceğini gösterirken, bazı çalışmalar eksozomların hedef hücrelere alınmasının hücre türüne özgü, doğru reseptör-ligand etkileşimleri ile gerçekleşebileceğini göstermektedir(133).

Membran füzyonu: Membran füzyonu, eksozomların hedef hücrelerin plazma membranı ile doğrudan birleşerek içeriklerini alıcı hücrelerin sitoplazmasına aktarmasıyla gerçekleşmektedir (133, 134).

Endositoz: Endositoz, hücrelerin parçacıkları veya molekülleri içine aldığı aktif bir süreçtir. Eksozomların hücre içine alınmasında en çok çalışılan endositik yollar klatriin bağımlı ve kaveolin aracılı endositoz, makropinositoz ve fagositozdur. Klatriin bağımlı endositoz, plazma membranının içeri bükülmesi için gerekli proteinlerin membranda bir araya

gelmesiyle başlamaktadır. Plazma membranının içeri doğru bükülmesiyle oluşan bu yapı sonraki aşamada klatrin ile kaplanarak klatrin örtülü çukur yapı oluşturmaktadır. Dinamin proteini ile yapının plazma membranından kopması gerçekleşmektedir(135).

Birçok ortak özelliğe sahip olan makropinositoz ve fagositoz mekanizmaları aynı zamanda oldukça önemli farklılıklara da sahiptir. Fagositoz hücre membran proteinlerine özgü reseptörlerin varlığını gerektiren aktin bağımlı bir endositoz türüdür. Fagositozun eksozomlar için bir alım mekanizmasından daha çok onların yok edilmesini sağlayan bir mekanizma olup olmadığı hala araştırılmaktadır (136).

3.5.EKSOZOMLARIN FİZYOLOJİK VE BİYOLOJİK GÖREVLERİ

Eksozomlar canlılardaki birçok biyolojik aktivite üzerinde pleotropik etki gösterebilmektedir. Eksozomlar fizyolojik açıdan kan pıhtılaşmasında, yara iyileşmesinde ya da immün sistemin düzenlenmesinde katkıda bulunurken, ek olarak eksozomların otoimmün sistem, bulaşıcı hastalıklar ve kanser gibi patofizyolojik durumlarda da önemli roller aldığı belirtilmektedir (137).

Birçok hücre tarafından salınan; tükürük, idrar ve kan gibi tüm biyolojik sıvılarda bulunan eksozomların en önemli biyolojik özelliği kargo içeriklerini alıcı hücelere aktararak hücre içi iletişimde kilit bir role sahip olmalarıdır. Yapılan araştırmalarda, tümör hücrelerinden türetilen eksozomların sahip olduğu onkojenik kargo içeriğini alıcı hücelere aktararak hedef hücrelerde genetik ekspresyonu düzenlediği ve tümör gelişimi, metastazı ve ilaç direnci oluşumunda etkili olduğu bildirilmiştir. Eksozom ve hücre arasında gerçekleşen bu mekanizmaların ilerleyen zamanlarda tam olarak anlaşılması immün kontrol noktası blokajı gibi yeni kanser tedavi yöntemlerinin bulunmasına olanak sağlayabilir (138, 139).

Eksozomlar köken aldıkları hücelere benzer özellik göstermeleri ve bu hücelere özgü yüzey belirteçleri taşımaları sayesinde birçok hastalık için tanısal araç olarak kullanılabilir (140). Eksozomların hastalıkların erken tanı ve teşhisinde kullanılması, biyogenez sırasında seçilen eksozomal kargo içeriğinin yüzey belirteçleri açısından zengin olması temeline dayanmaktadır. Zengin protein içeriği sayesinde eksozomlar tespit edilemeyecek kadar az oranda eksprese edilen yüzey belirteçlerinin bulunmasına olanak sağlamaktadır. Eksozomların diğer bir biyolojik özelliği ise immün modülasyonunda görev almalarıdır (140, 141).

Eksozomlar köken aldığı hücre türüne bağlı olarak immün baskılayıcı ya da immün uyarıcı özellik gösterebilmektedir. Kanser hücreleri tarafından galektin 9 ve Fas ligandı gibi immün hücrelerin apoptozunu indükleyen kargo içeriğine sahip eksozomların üretimi ve salımı, kanser hücrelerinin immünsupresif etki için kullandığı mekanizmalardan biridir (139). Antijen sunan hücrelerden salınan eksozomlar immünolojik cevap aktivasyonunda önemli bir role sahiptir. Antijen sunan dendritik hücrelerden türetilen eksozomların, antijene özgü T hücresi aktivasyonunu indüklediği belirtilmektedir (142).

Hücrelerdeki gereksiz, istenmeyen hücresel atıkları veya toksik ürünleri dışarı atmakta görev alan eksozomlar sahip oldukları bu biyolojik özellikleriyle hücreleri iç ve dış strese karşı korumaktadır. Yapılan çalışmalarda retikülositlerin eritrositlere olgunlaşması sırasında hücre için hiçbir işlevsel özelliği bulunmayan transferin reseptörlerinin eksozomlar ile hücreden uzaklaştırıldığı gösterilmektedir (143). Eksozomların sahip olduğu bu önemli biyolojik ve fizyolojik özellikler üzerine çok sayıda araştırma yapılmıştır ve bu araştırmalar geliştirilerek devam etmektedir. Bu çalışmalar arasında eksozomların doku onarımı ve rejenerasyonuna olan

etkisi henüz araştırmacılar tarafından yeteri kadar aydınlatılamamış olsa da, eksozomlar hücre ve doku mühendisliği uygulamaları için oldukça ümit verici yeni stratejiler sunmaktadır (144).

3.6.KIKIRDAK HASARINDA EKSOZOMLAR

Hastalıklı ya da zarar görmüş dokuların onarımı ve rejenerasyonu için mezenkimal kök hücrelerden (MKH) ve diğer hücre kaynaklarından türetilen ekstraselüler veziküllerin kullanımı rejeneratif tıp uygulamaları için alternatif bir seçenek sunmaktadır. Son yıllarda ekstraselüler veziküllerin, özellikle eksozomların doku mühendisliği alanındaki potansiyelinin anlaşılması için çok sayıda çalışma gerçekleştirilmesine rağmen, nanoboyuttaki bu küçük veziküllerin doku onarımı ve rejenerasyonundaki potansiyeli ile ilgili aydınlatılması gereken daha birçok nokta bulunmaktadır.



4.MATERYAL METOD

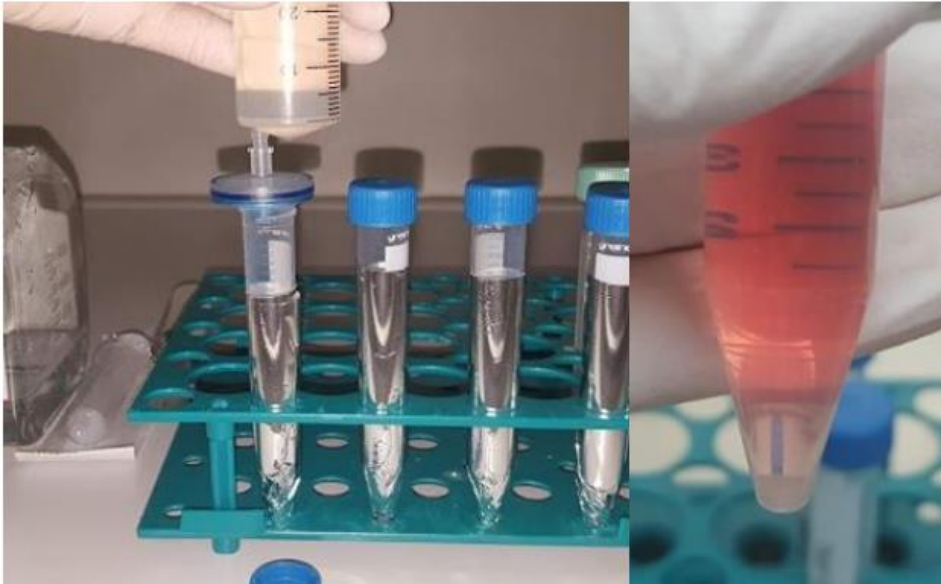
“Kıkırdak hasarı tedavisinde intraartiküler eksozom tedavisi: Deneyisel çalışma” başlıklı araştırma projemiz 10.08.2021 tarihinde 2021-045 protokol numarası ve 2021/08-8 karar numarası ile Yeditepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunca bilimsel ve etik açıdan uygun görülüp onaylanmıştır. Tüm deneysel çalışmalar Yeditepe Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi araştırma ünitesi ve ameliyathanelerinde yapılmıştır.

4.1.ÇALIŞMA PLANI

Çalışmamıza iskelet maturasyonu tamamlanmış, ağırlığı ortalama 350 gram, Sprague-Dawley ırkından 32 dişi sıçan dahil edilmiştir. Hayvanlar kontrollü sıcaklık ve ışık altında konvansiyonel şartlarda, hareketlerini kısıtlayacak standart kafeslerde barındırılmıştır. Su ve gıdaya serbest erişimleri sağlanmıştır. Sıçanların sağ dizlerinde çalışılmış, toplam 32 diz çalışmada değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda 32 sıçan 4 grup olacak şekilde incelenmiştir. Her bir deneğin sağ dizinde önce cerrahi yöntemlerle osteokondral defekt oluşturulmuş ardından ; 1. Gruba memeli kaynaklı (foreskin ve sağlıklı kıkırdak) eksozom, 2. Gruba bitki kaynaklı (ananas ve kabak) eksozom, 3. Gruba mikrokirik yöntemi ve 4. Grupta kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir.

Memeli kaynaklı eksozom verilecek grup (n:10) ikiye bölünerek; birinci gruba (n:5) sağlıklı kıkırdak dokusundan elde edilen eksozomlar, ikinci gruba foreskin kaynaklı (n:5) mezenkimal kök hücrelerden elde edilen eksozomlar verildi.2. grup dediğimiz bitki kaynaklı eksozom verilen deneklerimiz (n:10) iki gruba ayrıldı. Birinci gruba ananas kaynaklı (n:5) eksozom, ikinci gruba kabak kaynaklı (n:5) eksozom verildi. Geriye kalan ratlarda ikiye bölünerek mikrokirik grubu (n:6) ve kontrol grubunu (n:6) oluşturdular.



Resim 2: Çalışmada kullanılan eksozomlar; kıkırdak kaynaklı, foreskin kaynaklı, ananas kaynaklı ve kabak kaynaklı eksozom

4.2.HAYVANLARIN HAZIRLANMASI, CERRAHİ TEKNİK ve DENEYSEL MODEL

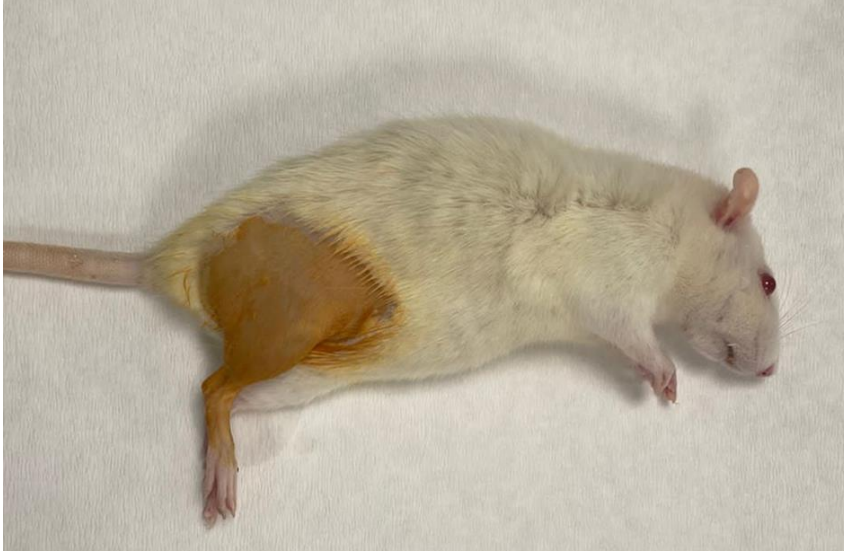
4 gruptaki deney hayvanlarına da aynı cerrahi öncesi prosedür uygulandı. Denek hayvanlarının ortalama ağırlıkları 350 gr olarak hesaplandı. Bu prosedüre göre hayvanlara verilmek üzere 0. dakikada 10 mg/kg Xylazine HCl (Rompun®, Bayer) ve 3. dakikada 90mg/kg Ketamin HCl (Ketalar®, Pfizer) insülin enjektörü ile intraperitoneal olarak verilerek anestezi uygulandı.

Cerrahi süresi boyunca ihtiyaç duyulması halinde 0,1ml ek doz uygulandı. Post-operatif dönemde hayvanların rahat olabilmeleri için ılık ortamda bakımları sağlanmış, 1 gün boyunca pansumanlarının korunmasına dikkat edildi.



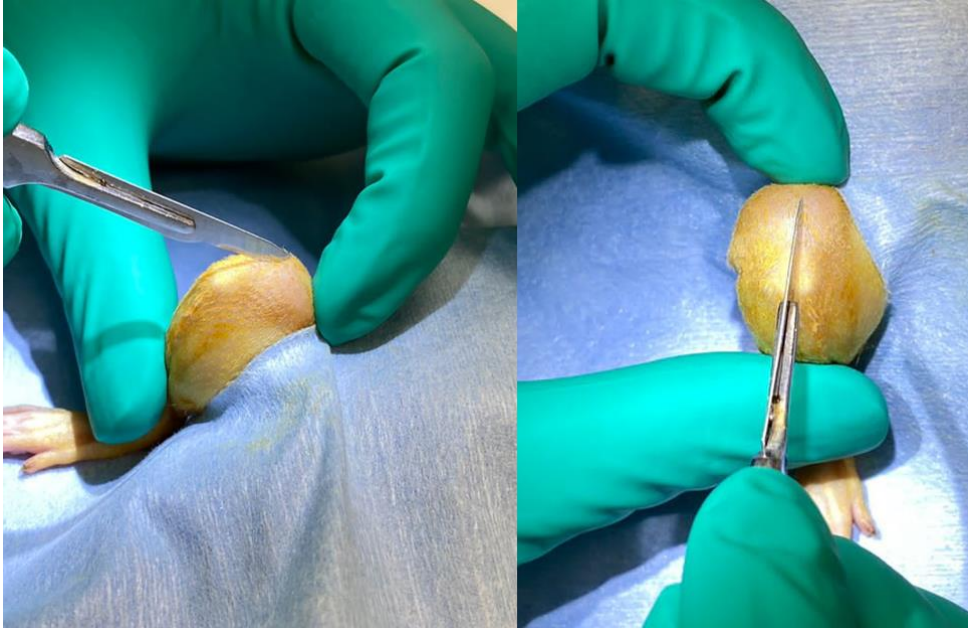
Resim 3: Çalışmada kullanılan ameliyat sahası ve cerrahi setler

.Klasik anestezi prosedürü uygulanıp denek hayvanlarının indüksiyonu sağlandıktan sonra bütün ratların sağ dizleri yıkanıp traş edildi. Antiseptik olarak %10'luk Povidon-İyot içeren Batticon (Adeka, İstanbul) solüsyonu kullanıldı. Batticon ile hayvanların dizleri steril edildi. Cerrahi steril örtü kullanılarak örtme işlemi sağlandı. Ortopedi cerrahisinde kullandığımız küçük kemik ve küçük yumuşak doku setleri steril olarak temin edildi.



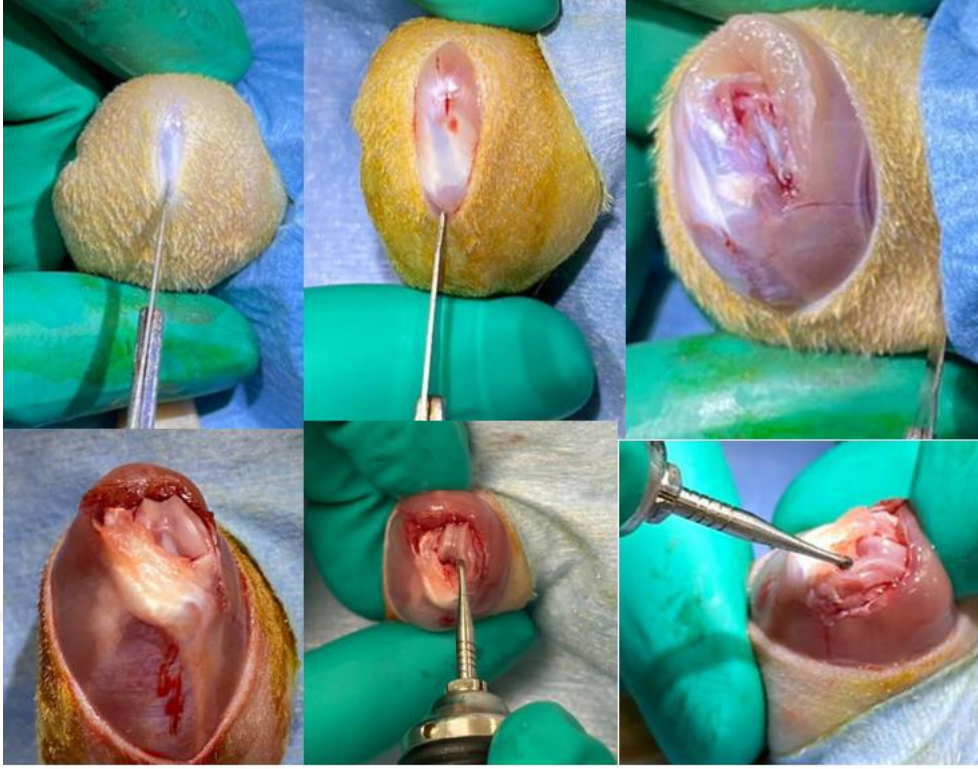
Resim 4: Cerrahi operasyon için hazırlanan rat; Cerrahi operasyon için anestezi almış, operasyon bölgesi traş edilmiş ve antiseptik solüsyon ile cerrahi saha steril olarak hazırlanmış

Ratların sağ dizlerine diz fleksiyondayken patella üst polünden başlayıp tuberositas tibiaya kadar uzanan longitudinal insizyon yapıldı. Cilt cilt altı yumuşak doku bağlantıları ve kanlanması korunarak tek kesi ile geçildi. Medial parapatellar yaklaşım ile artrotomi yapıldı. Patella laterale devrilerek femoral kondiller ortaya konuldu.

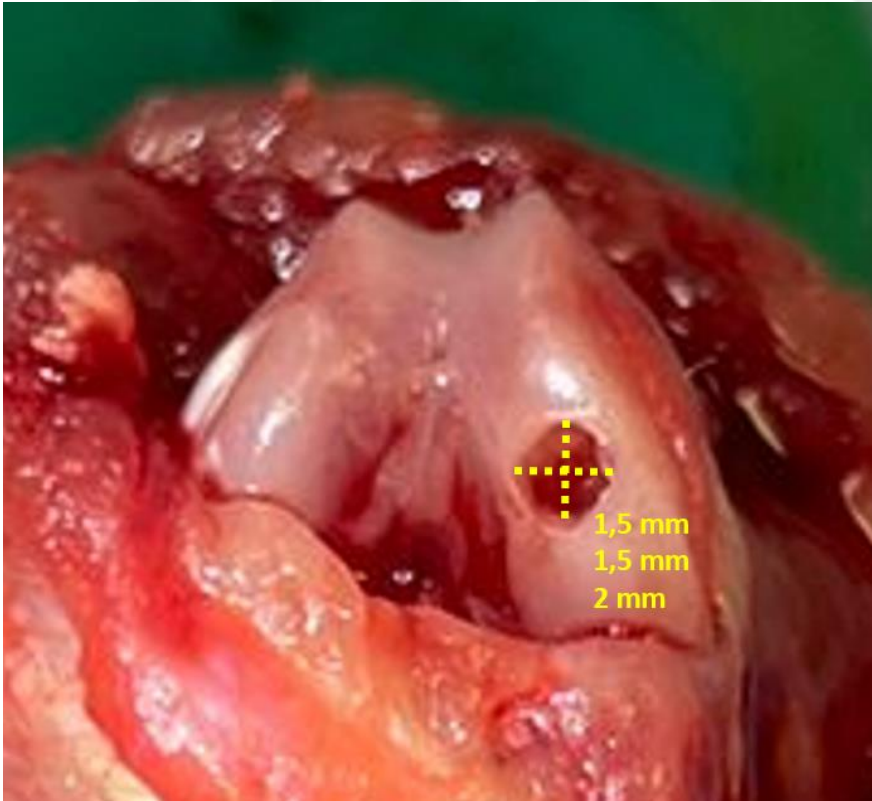


Resim 5: Rat dizinde cerrahi örtüm sonrası operasyon başlangıç anı

Medial femoral kondilde 1,5 mm çapında ve 1 mm derinliğinde silindirik tam kat kondral defekt dril yardımıyla oluşturuldu. Diz eklemi serum fizyolojik ile yıkandı.



Resim 6: Cerrahi operasyon aşamaları



Resim 7: Medial femoral kondilde 1,5x1,5x 2 mm büyüklüğündeki osteokondral defekt

Eklem kapsülü Ethicon marka 2-0 vicryl ile usulüne uygun kapatıldı. Ciltaltı ve cilt 3-0 prolene ile usulüne uygun şekilde kapatıldı. Cerrahi işlemden sonra deneklerin ağrısını azaltmak için Carprofen 4 mg/kg ve profilaktik antibiyotik olarak Cephtriaxon Na sodyum 50 mg/kg 3 gün verildi. Cerrahi sonrasında ratların dizlerine herhangi bir tespit uygulanmadı ve serbest dolaşmalarına izin verildi.

Mikrokırık Uygulaması

Mikrokırık grubundaki ratlara osteokondral defekt oluşturulduktan sonra defekt sahasında subkondral kemiği geçecek şekilde k teli yardımı ile mikrokırık işlemi uygulandı.



Resim 8: Mikrokırık uygulaması

İntraartiküler eksozom uygulaması

Postoperatif 2. haftadan itibaren toplamda 3 defa olacak şekilde her hafta aynı gün ve saatte eksozom enjeksiyonu yapıldı. Deney hayvanları eklem içi enjeksiyon sonrası normal kafes aktivitesine bırakıldı



Resim 9: İşlem sonrası ratların takip edildiği kafesler

Memeli ve bitki kaynaklı eksozom uygulanacak gruplar 5'er rat olacak şekilde iki eşit gruba ayrıldı.

1. Gruba sağlıklı kıkırdaktan izole edilen eksozomlar, 100 mg/dl dozunda intraartiküler olarak birer hafta arayla 3 defa enjekte edildi.

2. gruba foreskin (sünnet derisi) mezenkimal kök hücre kaynaklı eksozomlar 100 mg/dl dozunda intraartiküler olarak birer hafta arayla 3 defa enjekte edildi.

3. gruba bitki-ananas kaynaklı eksozomlar, 100 mg/dl dozunda intraartiküler olarak birer hafta arayla 3 defa enjekte edildi.

4. gruba bitki-kabak kaynaklı eksozomlar, 100 mg/dl dozunda intraartiküler olarak birer hafta arayla 3 defa enjekte edildi.



Resim 10: Eklemiçi eksozom enjeksiyon uygulaması

En son enjeksiyondan sonra 2 hafta süre ile takip edildi. Takip sürelerinin sonunda ratlar karbondioksit tankında uygun şekilde sakrifiye edilerek sağ alt ekstremitelerinde femur diafizinin ortasından başlayıp tibia diafizinin ortasına kadar olan bölge osteotomi yapılarak çıkarıldı. Eklem kapsülüne kadar olan yumuşak dokular ve kaslar sıyrılarak eklem kapsülü, eklemiçi dokular ve distal femurlar histopatolojik inceleme için çıkarıldı.

4.3.DEĞERLENDİRME

Çalışmamızda makroskopik açıdan ICRS, mikroskopik açıdan histolojik ICRS skorumlama sistemi kullanıldı.

4.3.1.Makroskopik Değerlendirme:

Blok doku örneği makroskopik olarak Uluslararası Kıkırdak Araştırma Derneği Tamir Değerlendirmesi-1 (ICRS-1) skoru ile 2 farklı araştırmacı tarafından değerlendirildi.

1.DEFEKT ONARIMININ DERECEŚİ Çevre kıkırdak ile aynı seviyede Defekt derinliğinin %75'i tamir dokusu Defekt derinliğinin %50'si tamir dokusu Defekt derinliğinin %25'i tamir dokusu Defekt derinliğinin %0'ı tamir dokusu		4 3 2 1 0
SINIR BÖLGESİNE ENTEGRASYON Çevre kıkırdak ile tam entegrasyon Çevreyi belirleyen doku <1 mm Greftin ¾'ü entegre, ¼'ü 1 mm'den geniş belirgin sınır ile ayrı Greftin yarısı entegre, yarısı 1 mm'den geniş sınır ile ayrı Her taraf ayrı ya da ¼'e kadar ayrı		4 3 2 1 0
MAKROSKOPİK GÖRÜNÜM Sağlam düzgün yüzey Liflenmiş yüzey Küçük, dağınık çatlaklar, yarıklar Bir miktar, küçük yada az ama büyük çatlaklar Greftli alanın toplam dejenerasyonu		4 3 2 1 0
Değerlendirme	Toplam puan	
Grade I Normal	12	
Grade II Kısmen normal	11-8	
Grade III Anormal	7-4	
Grade IV Ciddi anormal	3-11	

Tablo 3: ICRS kıkırdak değerlendirme skalası

4.3.2.Histopatolojik Değerlendirme

Histopatolojik değerlendirme için ayrılan rat distal femoral kondil materyalleri % 10'luk formaldehitte 72 saat bekletildikten sonra doku örneklerine fiksasyon aşamasından sonra dokular Morse solüsyonunda (%10 sodyum sitrat ve %22,5 formik asit) dekalsifiye edildi. Doku Takip cihazı ile 15 saat süren doku takip işleminde alkol, ksilen ve parafin aşamalarından geçirilerek dehidratasyon, şeffaflandırma ve doku sertleştirme işlemi tamamlandı. Daha sonra doku gömme cihazında parafine gömme işlemi yapılarak dokular blok haline getirildi. Bloklar buzdolabında soğutulduktan sonra Leica marka mikrotom cihazında 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Hematoksilen Eozin boyama için kesit alınan preparatlar deparafinizasyon işlemi için etüve kaldırılarak 65 derecede 1,5 saat bekletildi. Etüvden çıkarılan preparatlar ksilende 20 dakika bekletildi. Etil alkol serilerinde (%100, %90, %80) 10 dakika tutularak çeşme suyunda yıkandı. Yıkama işleminden sonra Hematoksilen boyasında (Facepath marka) 2,5 dakika bekletildi. Tekrar çeşme suyunda yıkandıktan sonra asit alkol solüsyonuna 1 defa batırılıp tekrar çeşme suyuna alındı. Amonyaklı suya 3 defa batırılarak tekrar çeşme suyunda yıkamaya alındı. Yıkama işleminden sonra Eozin solüsyonuna 1,5 dakika bekletildi. Alkol serilerine (%80, %90, %100) 4-5 defa batırılarak boyama işlemi tamamlandı. Preparatlar kurutulmak üzere etüve kaldırıldı. Etüvden çıkarıldıktan sonra ksilende şeffaflanması için 10 dakika bekletildi. Ksilenden çıkarılan preparatlara entellan damlatılarak lam üzerine lamel kapatıldı. Kapama işleminin ardından mikroskopik incelemeye geçildi. Örnekler hangi gruba ait olduğu bilinmeden laboratuvara gönderilen numaraya göre etiketlenerek histoloğun kör değerlendirme yapması sağlandı.

Kıkırdak tamir yöntemlerinin makroskopik olarak değerlendirilmesinde temelde iki sistem vardır; ICRS (İnternational Cartilage Regeneration Society) ve OAS (Oswestry Arthroscopy Score). Smith ve ark. ICRS ve OAS 'ın geçerlilik değerlendirmesinde her iki skorlama sisteminin de kıkırdak tamir sonuçlarının değerlendirmesinde geçerli olduğunu saptamışlardır. OAS ICRS'den farklı olarak artroskopik greftin sertliğini değerlendirebilmektedir. ICRS greft hipertrofisinin değerlendirmesinde yetersiz bulunmasına rağmen artroskopik olarak değerlendirilemeyecek eklemler için önemini korumaktadır . Bizde çalışmamızda artroskopik olarak değerlendirilemeyecek kadar küçük eklem kullandığımız için geçerlilik bakımından fark taşımayan ICRS makroskopik ve mikroskopik değerlendirme sistemini kullanmayı planladık. Bu değerlendirme sisteminde defekt onarımın derecesi, sınır bölgesine entegrasyon ve makroskopik görünüm 4'er puan olmak üzere toplamda 12 puan üzerinden değerlendirilmektedir. Defekt onarımının derecesi çevre kıkırdak ile aynı seviyede ise 4 puan, defekt derinliğinin %75'i tamir dokusu ise 3 puan, derinliğinin %50'i tamir dokusu ise 2 puan, derinliğinin %25'i tamir dokusu ise 1 puan ve defekt derinliğinde değişiklik yoksa 0 puan olarak değerlendirilmektedir. Sınır bölgeye entegrasyon tam ise 4 puan, çevreyi belirleyen doku < 1mm ise 3 puan, defekt alanının $\frac{3}{4}$ 'ü entegre $\frac{1}{4}$ 'ü 1 mmden geniş belirgin sınır ile ayrı ise 2 puan, defekt alanının yarısı entegre yarısı 1 mmden geniş belirgin sınır ile ayrı ise 1 puan, her taraf ayrı ya da $\frac{3}{4}$ 'ü ayrı ise 0 puan olarak değerlendirilmiştir. Makroskopik görünüm sağlam düzgün yüzey ise 4 puan, liflenmiş yüzeyden oluşuyorsa 3 puan, küçük çatlak yarıklar içeriyorsa 2 puan, bir miktar küçük çatlaklar ile az sayıda büyük çatlaklar içeriyorsa 1 puan, tüm sahanın dejenerasyonu olması ise 0 puan olarak değerlendirilmiştir. Toplam puan 12 ise normal, 11-8 aralığında ise normale yakın, 7-4 aralığında ise anormal, 3-1 aralığında ise ileri düzey anormal olarak değerlendirilmektedir.

Mikroskopik olarak değerlendirmede tamir dokusunun kalınlığı, implante edilen doku kalıntılarının olup olmadığı ya da bunlara karşı immun reaksiyon durumu, tamir dokusunun

hiyalin kıkırdak içeriği, eklem yüzünün pürüz durumu, yeni oluşan kıkırdığın bütünlüğü, hiyalin kıkırdığın devamlılığı ve hücresel bileşenleri, tamir dokunun etrafı doku ile integrasyonu, subkondral kemik ile integrasyon, subkondral kemiğin durumu araştırılacak. Değerlendirme için geçerliliğini kanıtlamış ve objektif değerlendirme yöntemi olan yöntemlerden modifiye edilmiş ICRS değerlendirme skalası hem okuyucular arası hem de aynı okuyucunun tekrar değerlendirmelerinde yüksek oranda tutarlılık gösterdiği için diğer yöntemlere göre daha üstün kabul edilmiştir ve kullanılmıştır. Bu değerlendirme sisteminde hemotoksilen eozin ile yüzey özelliği devamlı ise 3 puan, devamlılığı bozulmuş düzensiz ise 0 puan olarak değerlendirilmiştir. Matris hiyalin kıkırdak içeriyorsa 3 puan, hiyalin ve fibröz kıkırdak içeriyorsa 2 puan, fibröz kıkırdak içeriyorsa 1 puan, fibröz dokudan oluşuyorsa 0 puan olarak değerlendirilmiştir. Hücrelerin dağılımı düzenli sütunlar halinde ise 3 puan, sütun ve kümeler halinde karışık ise 2 puan, kümeler halinde ise 1 puan, bağımsız düzensiz hücrelerden oluşuyorsa 0 puan olarak değerlendirilmiştir. Hücre popülasyonu baskın olarak canlı hücrelerden oluşuyorsa 3 puan, kısmen canlı hücreler içeriyorsa 1 puan, canlı hücreler < %10 ise 0 puan olarak değerlendirilmiştir. Subkondral kemik normal yapıda ise 3 puan, artmış remodelling varsa 2 puan, nekroz ya da granülasyon dokusu içeriyorsa 1 puan, alttan ayrılmış veya kallus oluşumu varsa 0 puan olarak değerlendirilmiştir. Kıkırdak mineralizasyonu normal ise 3 puan, anormal veya uygunsuz konumda ise 0 puan olarak değerlendirilmiştir. Tidemark devamlılığı normal ise 3 puan, devamlılığı bozulmuşsa 1 puan, devamlılığı hiç yoksa ya da hiç seçilemiyorsa 0 puan olarak değerlendirilmiştir. Bu skorlamalar sonucunda alınan puan ne kadar az ise kıkırdak tamirinin mikroskobik olarak o kadar başarısız olduğu söylenebilir.

1-YÜZEY	
Düzenli devamlı	3
Kesintili, irregüler	0
2-MATRİKS	
Hyalin	3
Hyalin/fibrokartilaj	2
fibrokartilaj	1
Fibröz doku	0
HÜCRE DAĞILIMI	
Kolumnar yapı	3
Kolumnar-Cluster	2
Cluster	1
Tek tek hücreler	0
HÜCRE POPULASYONU CANLILIĞI	
Çoğu canlı	3
Kısmen canlı	2
%10 altında canlı	0
SUBKONDRAL KEMİK	
Normal	3
Artmış remodelling	2
Kemik nekrozu Granülasyon dokusu	1
Tutunmama, kırık	0
KIKIRDAK MİNERALİZASYONU	
Normal	3
Anormal, uygunsuz lokalizasyon	0

Tablo 4: ICRS histolojik değerlendirme skalası

4.3.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Çalışmamızda ratlardan elde edilen eklem kıkırdığı dokularında SOX9, Tip II Kollajen ve Aggrekan ekspresyonunu belirlemek için avidin-biotin-peroksidaz yöntemi uygulandı. Polilizinli lamlara alınan eklem kıkırdığı kesitleri bir gece inkübe edilmek üzere etüvde 60°C’de bekletildi. Ardından ksilen ve azalan alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edildi ve 3 dakika distile su ile yıkanarak alkol uzaklaştırma işlemi yapıldı. Daha sonra antijen geri kazanım için % 10’luk hazırlanan sitrat buffer içerisinde elektrikli ocak üzerinde ısı geçirimi sağlanacak şekilde bir kapta sabitlenerek yaklaşık 30 dakika 82°C’de ısı işlemi uygulandı. Sonrasında soğuması için 10’ar dakika aralıklarla soğuk su bulunan bir kap içerisinde sitrat buffer dökülmeden şale ile birlikte lamalar yerleştirildi ve 2 kez suyu ısı alış verışı için değiştirildi. Distile su ile 5 dakika yıkanan preparatlar ardından fosfat tamponu (PBS) ile yıkama işlemine tabi tutuldu. Endojen peroksidaz aktivesini engellemek için preparatlar 20 dakika % 3’lük hidrojen peroksidaz (H₂O₂) içerisinde bekletildi. Ardından 3 defa 5’er dakika tekrarlı PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Antijenik alanların dışında kalan alanların kapatılmasını sağlayan serum blok 5 dakika bekletilmek üzere boyama kiti Thermo Scientific içerisinde alınarak dokular üzerine damlatıldı ve nem kabinine preparatlar dizildi. Daha sonra ilk damlatılan preparattan başlanılarak PBS ile yıkama işlemi 1-2 defa çalkalanmak üzere yıkama gerçekleştirildi ve ardından sırasıyla ayarlanan dokulara SOX9, Tip II kollajen ve Agrekan Primer Antikorları belirlenen oranlarda hazırlanarak (SOX9:1/250, Tip II Kollajen ve Agrekan:1/100) damlatıldı. Negatif kontrol için dokulara sadece antikor dilüsyon solüsyonu damlatıldı. Ardından nem kabininde bulunan preparatlar 1 gece +4°C’de bekletilerek ve ertesi gün 30 dakika oda ısısında soğumaya bırakılarak inkübe edildi. PBS ile yıkama 3 defa 5 ‘er dakika olmak üzere tekrar edildi. Daha sonra dokulara bağlanma özelliği gösteren Biotin-Sekonder Antikor ile 30 dakika oda ısısında nem kabininde inkübe edildi. 3 kez tekrarlanan PBS ile 5’er yıkama işleminden sonra 25 dakika Streptavidin-Peroksidaz dokulara damlatılarak nem kabininde bekletildi. Yeniden 3 kez PBS ile 5’er dakika yıkama işleminden sonra immünreaktiviteyi görünür hale getirmek için Di-Amino-Benzidin (DAB) ile 15 dakika muamele edildi. Ardından 3 kez 5’er dakika distile su ile yıkama işleminden sonra hazırlanan 4/1 oranında Gill hemotoksilen ile 5 dakika muamele edilerek zıt boyanan kesitler elde edildi ve akan musluk suyunda 5 dakika yıkama işlemi gerçekleştirildi. Son olarak artan alkol serilerinden geçirilen dokuların suyu uzaklaştırılıp ksilenle geçirilerek şeffaflaştırma ve kapatma solüsyonu Entellan ile kapatıldı.

Gruplar arasında SOX9, Tip II Kollajen (COL-II) ve Agrekan (ACAN) Gen ekspresyon düzeyleri immünohistokimya sonucu ölçüm yapılarak değerlendirildi

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

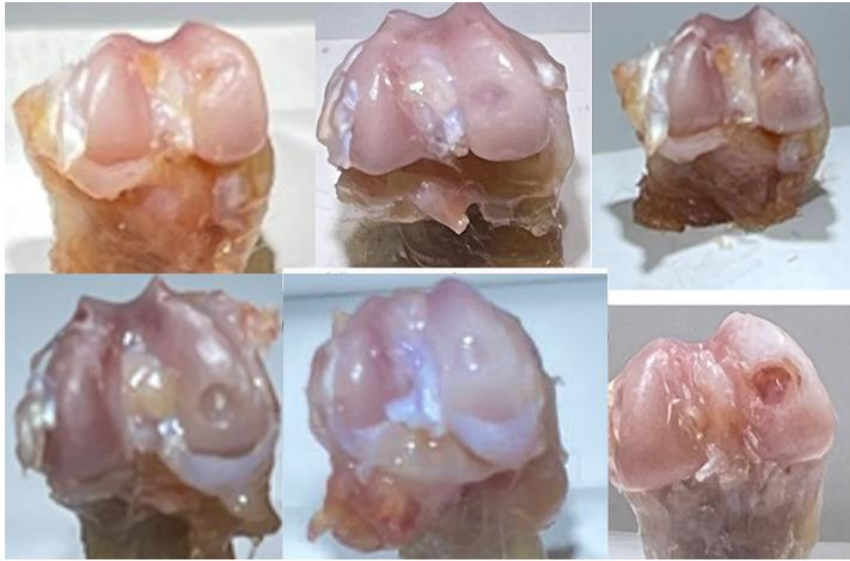
Bu çalışmada yapılan istatistiksel analizler IBM SPSS Statistics 28.0 (IBM, Armonk, NY, ABD) kullanılarak yapıldı ve tüm testlerde anlamlılık düzeyi %5 yani $\alpha = 0.05$ olarak alındı.

Çalışmadaki tüm verilerin tanımlayıcı istatistiksel değerleri hesaplanmıştır (ortalama, standart sapma, ortanca). Normal dağılım göstermeyen parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis test, farklılığa neden çıkan grubun tespitinde post hoc Dunn test kullanıldı. Diğer değişkenlerin kontrol ve deney gruplarına göre ortalamalarının birbirinden farklı olup olmadığını test ederken parametrik olmayan testlerden bağımsız örneklem Mann-Whitney U testi kullanıldı.

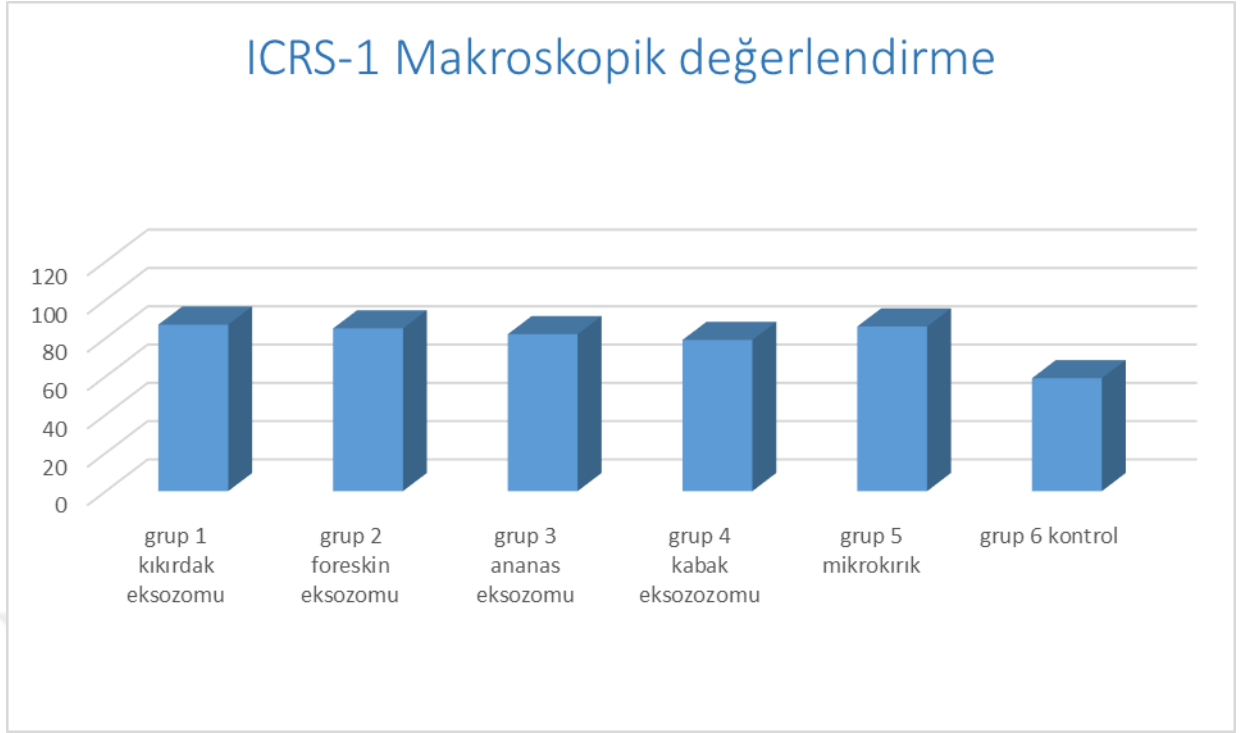
5. BULGULAR

5.1 MAKROSKOPİK BULGULAR

Elde edilen doku örnekleri iki farklı araştırmacı tarafından çift kör olarak ICRS skora sistemine göre makroskopik olarak değerlendirildi. Makroskopik ICRS skoru; defekt derinliğinin tamir dokusuna oranı, çevre kıkırdak bölgesine entegrasyon ve kıkırdak tamir dokusu yüzeyinin görünümü açısından toplam 0 ile 12 puan arasında değerlendirildi. Ortalama ICRS skorları kıkırdak eksozom grubunda 8,7 puan, foreskin eksozom grubunda 8,5 puan, ananas eksozom grubunda 8,2 puan, kabak eksozom grubunda 7,9 puan, mikrokırık grubunda 8,3 puan ve kontrol grubunda 5,8 puan olarak hesaplanmıştır. Deney grupları kendi içerisinde karşılaştırıldığında kıkırdak eksozomu, foreskin eksozomu, ananas eksozomu ve kabak eksozomu ortalama skorları arasında istatistiksel olarak farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$). Eksozom verilen grup ile mikrokırık grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$). Deney grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; kıkırdak eksozom grubunun ($p<0.001$), foreskin grubunun ($p<0.001$), ananas eksozom grubunun ($p<0.001$) ve kabak eksozom grubunun ($p<0.001$) ortalama değerlendirme skorlarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır.



Resim 11: Medial femoral kondilin makroskopik görüntüleri

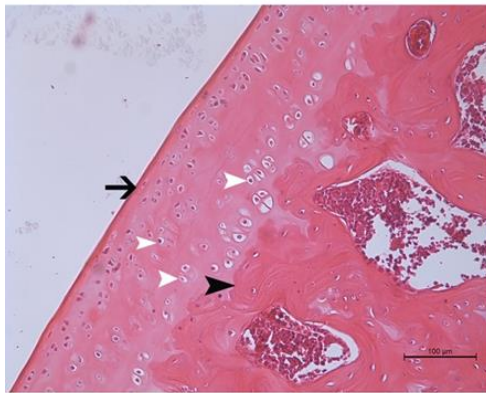


Tablo 5 :Çalışma gruplarının ortalama ICRS-1 skorlarının karşılaştırılması

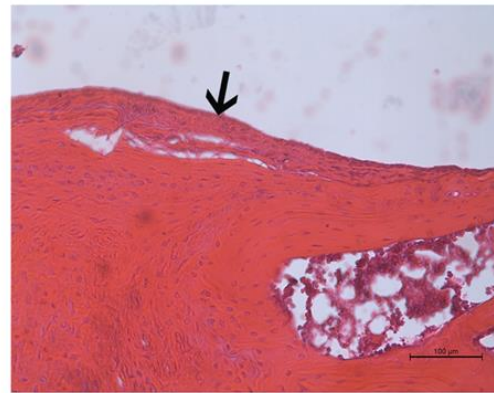
5.2 MİKROSKOPİK BULGULAR

Mikroskopik olarak histolojik parametleri değerlendirmek için kesit alınan dokulara hematoxilen eozin ile histokimyasal boyamalar yapıldı. Deneklerden elde edilen diz osteokondral defekt modeline ait kesitler, 6 kriterden oluşan histolojik skrolama sistemi olan ICRS ile değerlendirildi. Histopatolojik incelemeler sırasında preparatların fotoğrafları çekilerek histolojik veriler kayıt altına alındı

KONTROL



x20

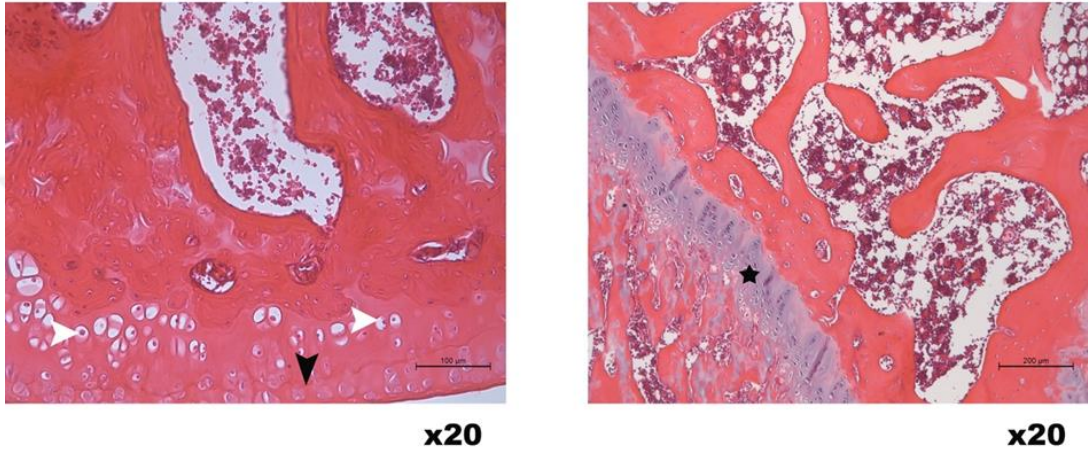


x20

Resim 12: Kontrol grubuna ait histolojik görüntü

KONTROL grubuna ait Hematoksilen Eozin ile boyanmış histolojik görüntü. Resimde siyah oklar kıkırdak yüzeyini, siyah ok başı tidemark'ı ve beyaz ok başı kıkırdak hücrelerini göstermektedir. Resimde kıkırdak yüzeyinde fibröz oluşumlar dikkat çekicidir. Kıkırdak hücrelerinin proliferasyon olarak düzensizliği görülmektedir. Sol taraftaki resimde tidemark belirgindir. Resimlerde sol taraftaki görüntü kapsülü göstermektedir. Sağ taraftaki resimde Kıkırdak yüzeyinde fibröz doku oluşumu gözlemlenmiştir. Resimler x20'lik büyütmededir. Skala 100 mikrometredir.

SAGLIKLI



Resim 13:Sağlıklı kondrosit kaynaklı eksozom verilen gruba ait histolojik görüntü

SAĞLIKLI gruba ait Hematoksilen Eozin ile boyanmış histolojik görüntü. Resimde siyah ok başı tidemark'ı, beyaz ok başı kıkırdak hücrelerini ve siyah yıldız endokondral kemikleşmeyi göstermektedir. Kıkırdak hücrelerinin proliferasyon olarak düzensizliği görülmektedir. Resimde tidemark belirgindir. Resimlerde sol taraftaki görüntü kapsülü göstermektedir. Resimler x20'lik büyütmededir. Skala 100 mikrometredir.

Tablo 6'da grupların histolojik incelemelerinin ICRS skorlarına göre ortalama sonuçları $\pm$ standart deviasyon değerleri ve median değerleri verilmiştir. Histolojik olarak incelendiğinde, ICRS histolojik skora göre tamir dokusu yüzeyi değerlendirildiği zaman; kıkırdak eksozom grubunda üç örnekte, foreskin eksozom grubunda üç örnekte, ananas eksozom grubunda iki örnekte, kabak eksozom grubunda bir örnekte ve mikrokırık grubunda iki örnekte düz (regüler) iken kontrol grubundaki örneklerin tamamı irregülerdi.

ICRS histolojik skora göre kıkırdak hücre dağılımı değerlendirildiği zaman; kıkırdak eksozom grubunda bir örnekte ve mikrokırık grubunda bir örnekte hücreler kolon şeklinde yerleşim gösteriyordu.

ICRS histolojik skora göre hücre matriks yapısı değerlendirildiği zaman; kıkırdak eksozom grubunda bir örnekte, foreskin eksozom grubunda bir örnekte, ananas eksozom grubunda iki örnekte, kabak eksozom grubunda bir örnekte ve mikrokırık grubunda iki örnekte hyalin benzeri görüntü vardı.

ICRS histolojik skora göre hücre popülasyon canlılığı değerlendirildiği zaman; kıkırdak eksozom grubunda iki örnekte, foreskin eksozom grubunda üç örnekte, ananas eksozom grubunda bir örnekte, ve mikrokırık grubunda iki örnekte hücrelerin çoğu canlı idi.

ICRS histolojik skora göre subkondral kemiğin özelliği değerlendirildiği

zaman; kıkırdak eksozom grubunda bir örnekte, foreskin eksozom grubunda iki örnekte, ananas eksozom grubunda bir örnekte normal subkondral kemik görüntüsü vardı.

ICRS histolojik skorlama sistemine göre kıkırdak mineralizasyonu değerlendirildiği zaman; kıkırdak eksozom grubunda üç örnekte, foreskin eksozom grubunda üç örnekte, ananas eksozom grubunda bir örnekte, ve mikrokırık grubunda iki örnekte kıkırdak mineralizasyonu normal görünümde idi.

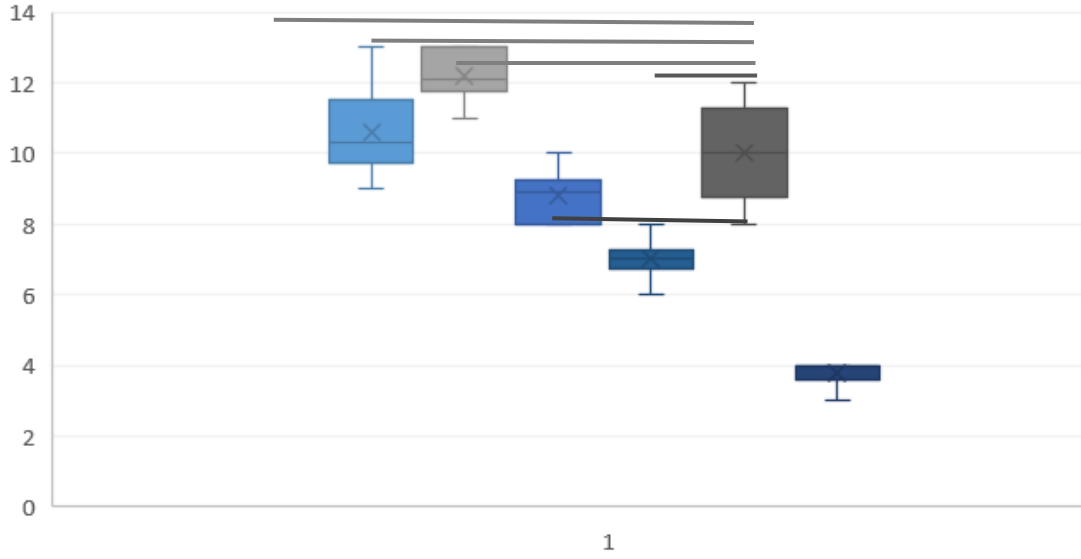
		KIKIRDAK EKSOZOMU	FORESKİN EKSOZOMU	ANANAS EKSOZOMU	KABAK EKSOZOMU	MİKROKIRIK GRUBU	KONTROL GRUBU
KIKIRDAK YÜZEY ÖZELLİĞİ	Ort±sd	1,80±1,63	1,80±1,63	1,20±1,64	0,60±1,34	1,20±1,64	0
	Med	3	3	0	0	0	0
KIKIRDAK MATRİKS YAPISI	Ort±	2±0,70	2,20±0,44	1,80±1,09	1,80±0,83	2,40±0,54	1,20±0,83
	Med	2	2	1	2	2	1
HÜCRE DAĞILIMI	Ort±sd	1,80±0,83	1,60±0,54	1,40±0,54	1,20±0,44	1,60±0,89	0,81±0,83
	Med	2	2	1	1	1	1
HÜCRE POPÜLASYON CANLILIĞI	Ort±sd	2±1,22	2,60±0,54	1,80±1,09	1,20±1,09	2±1,22	0,8±1,09
	Med	2	3	2	2	2	0
SUBKONDRAL KEMİK ÖZELLİĞİ	Ort±sd	1,80±0,83	2,20±0,83	1,40±1,14	1,60±1,34	1,60±0,89	1±0,70
	Med	2	2	1	2	2	1
KIKIRDAK MİNERALİZASYONU	Ort±sd	1,20±1,64	1,80±1,64	1,20±1,64	0,60±1,34	1,20±1,64	0±0
	Med	0	3	0	0	0	0
TOTAL ICRS SKORU	Ort±sd	10,60±1,51	12,20±0,83	8,8±0,83	7±0,70	10±1,58	3,80±0,44
	med	10	12	9	7	10	4

Tablo 6 Grupların elde edilen ICRS skorlarının ortalama ve median değerleri

Histolojik olarak ICRS sınıflandırmasının parametreleri gruplara göre incelendiğinde; foreskin eksozomu grubunun ortalama skorunun 12,20±0,83 olduğu, kıkırdak eksozomu grubunun ortalama skorunun 10,60±1,51 olduğu, ananas eksozomu grubunun ortalama skorunun 8,8±0,83 olduğu, kabak eksozomu grubunun ortalama skorunun 7±0,70 olduğu, mikrokırık grubunun ortalama skorunun 10±1,58 olduğu ve kontrol grubunun ortalama skorunun 3,80±0,44 olduğu saptanmıştır. Ortalama ICRS skorlarına baktığımız zaman foreskin grubunun en yüksek skora sahip olduğu, kıkırdak eksozom grubunun ikinci en yüksek skora sahip olduğu, ananas eksozom grubunun üçüncü en yüksek skora sahip olduğu kabak eksozom grubunun ise diğer üç gruptan daha düşük bir skora sahip olduğu görülmekle beraber istatistiksel olarak diğer gruplarla kabak grubunun arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır (p değeri sırasıyla: 0,22, 0,17 ve 0,38). Grupları kendi arasında ve kontrol grubu ile karşılaştırdığımız zaman; kıkırdak eksozomu, foreskin eksozomu, ananas eksozomu ve kabak eksozomu gruplarının ortalama ICRS skorlarında kontrol grubunun skoruna göre istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (sırasıyla; p<0.001, p<0.001, p<0.001, p<0.004).

Kıkırdak eksozom grubunun, foreskin eksozom grubunun, ananas eksozom grubunun ve kabak eksozom grubunun hem total ICRS Skorları, hem de kıkırdak yüzey özelliği, kıkırdak matriks yapısı, hücre dağılımı, hücre popülasyon canlılığı, subkondral kemik özelliği ve kıkırdak mineralizasyonu ortalama değerleri ile kontrol grubunun değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (p<0.001).

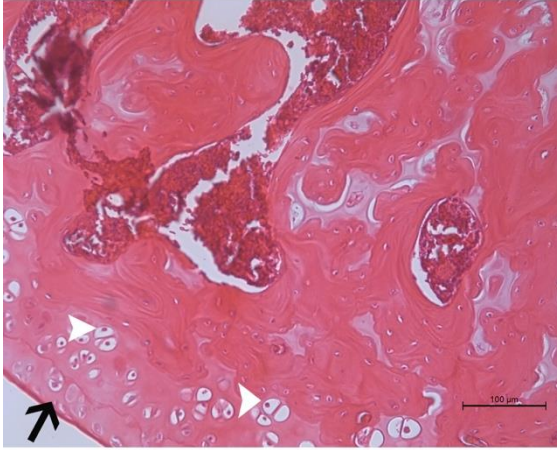
ICRS Histolojik Skor Ortalama Değerleri



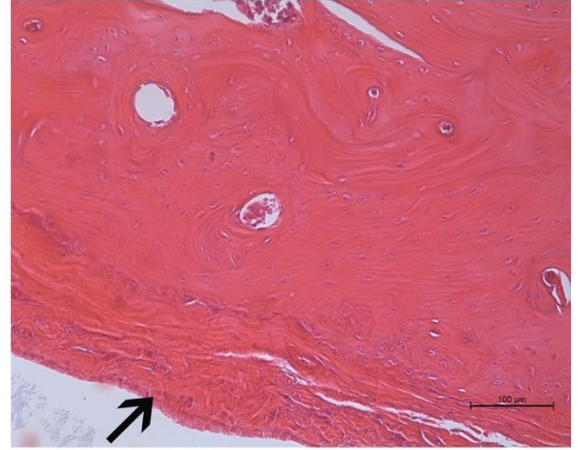
(Kruskal Wallis test&post hoc Dunn test $p<0.05$)

Tablo 7 :Çalışma gruplarının ICRS skorlarının karşılaştırılması

KABAK



x20



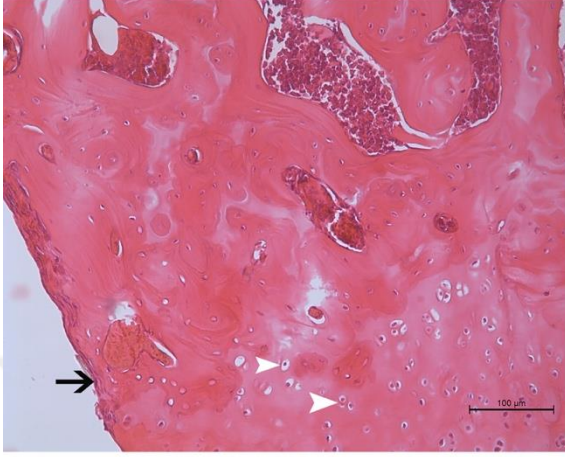
x20

Resim 14: Kabak grubuna ait histolojik görüntüler

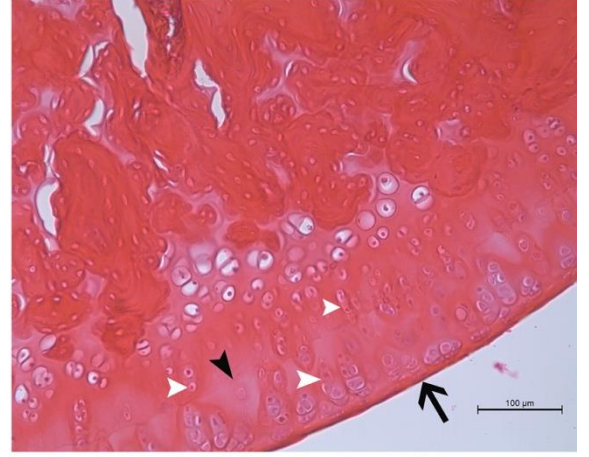
KABAK grubuna ait Hematoksilen Eozin ile boyanmış histolojik görüntü. Resimde siyah oklar kıkırdak yüzeyini, siyah ok başı tidemark'ı ve beyaz ok başı kıkırdak hücrelerini göstermektedir. Resimde kıkırdak yüzeyi düzgün seyretmiştir. Kıkırdak hücrelerinin proliferasyon olarak düzensizliği görülmektedir. Resimlerde sol taraftaki görüntü kapsülü

göstermektedir. Sağ taraftaki resimde fibröz dokunun varlığı dikkat çekicidir. Resimler x20'lik büyütmededir. Skala 100 mikrometredir.

ANANAS



x20

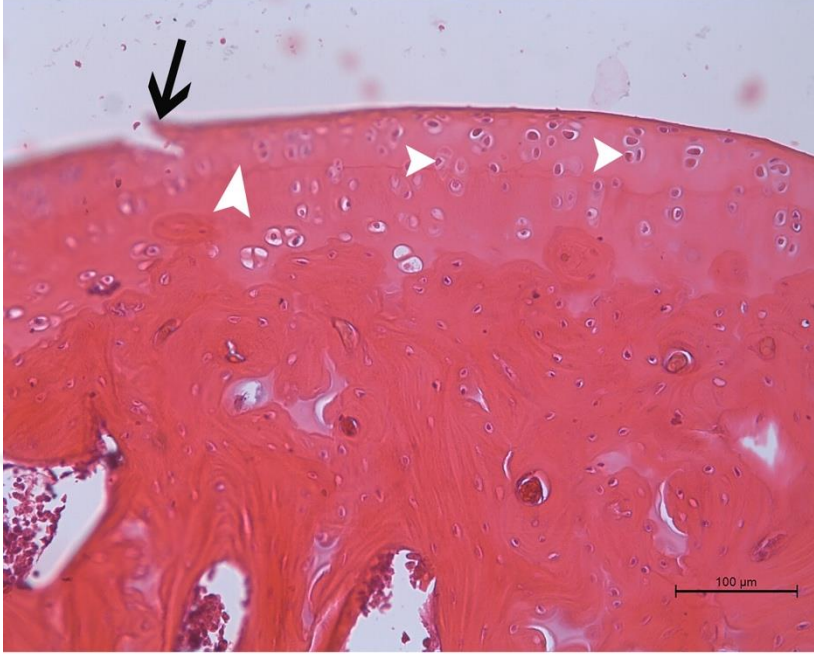


x20

Resim 15: Ananas grubuna ait histolojik görüntüler

ANANAS grubuna ait Hematoksilen Eozin ile boyanmış histolojik görüntü. Resimde siyah oklar kıkırdak yüzeyini, siyah ok başı tidemark'ı ve beyaz ok başı kıkırdak hücrelerini göstermektedir. Resimde kıkırdak yüzeyinde fibröz oluşumlar dikkat çekicidir. Kıkırdak hücrelerinin proliferasyon olarak düzensizliği görülmektedir. Sol taraftaki resimde tidemark belirgin değildir. Resimlerde sol taraftaki görüntü kapsülü göstermektedir. Sağ taraftaki resimde Kıkırdak yüzeyi normal histolojik boyutundadır. Resimler x20'lik büyütmededir. Skala 100 mikrometredir.

FORESKIN

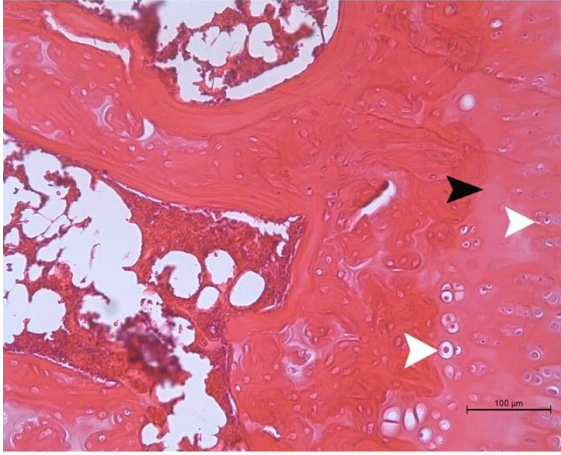


x20

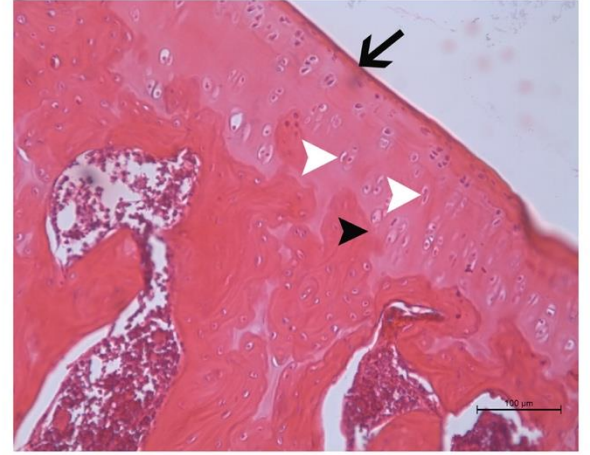
Resim 16: Foreskin grubuna ait histolojik görüntü

FORESKIN grubuna ait Hematoksilen Eozin ile boyanmış histolojik görüntü. Resimde siyah kıkırdak yüzeyini ve beyaz ok başı kıkırdak hücrelerini göstermektedir. Resimde kıkırdak yüzeyinde düzensizlik dikkat çekicidir. Kıkırdak hücrelerinin proliferasyon olarak düzensizliği görülmektedir. Resim x20'lik büyütmededir. Skala 100 mikrometredir.

MIKROKIRIK



x20



x20

Resim 17:Mikrokirik grubuna ait histolojik görüntüler

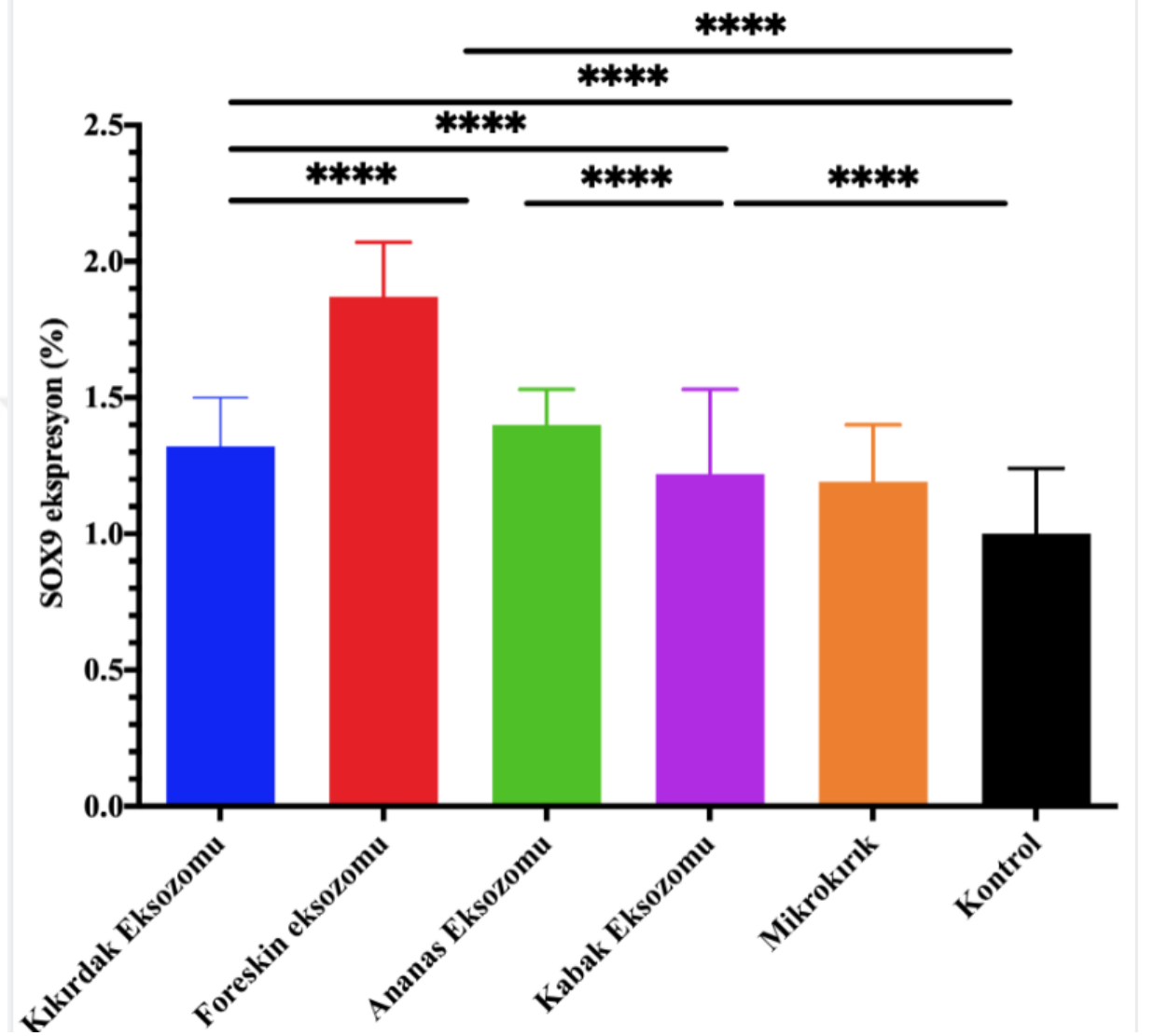
MİKROKIRIK grubuna ait Hematoksilen Eozin ile boyanmış histolojik görüntü. Resimde siyah oklar kıkırdak yüzeyini, siyah ok başı tidemark'ı ve beyaz ok başı kıkırdak hücrelerini göstermektedir. Resimde kıkırdak yüzeyinde hafif derecede fibröz oluşumlar dikkat çekicidir. Kıkırdak hücrelerinin proliferasyon olarak düzensizliği görülmektedir. Resimde tidemark belirgindir. Resimlerde sol taraftaki görüntü kapsülü göstermektedir. Resimler x20'lik büyütmededir. Skala 100 mikrometredir.

5.3. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

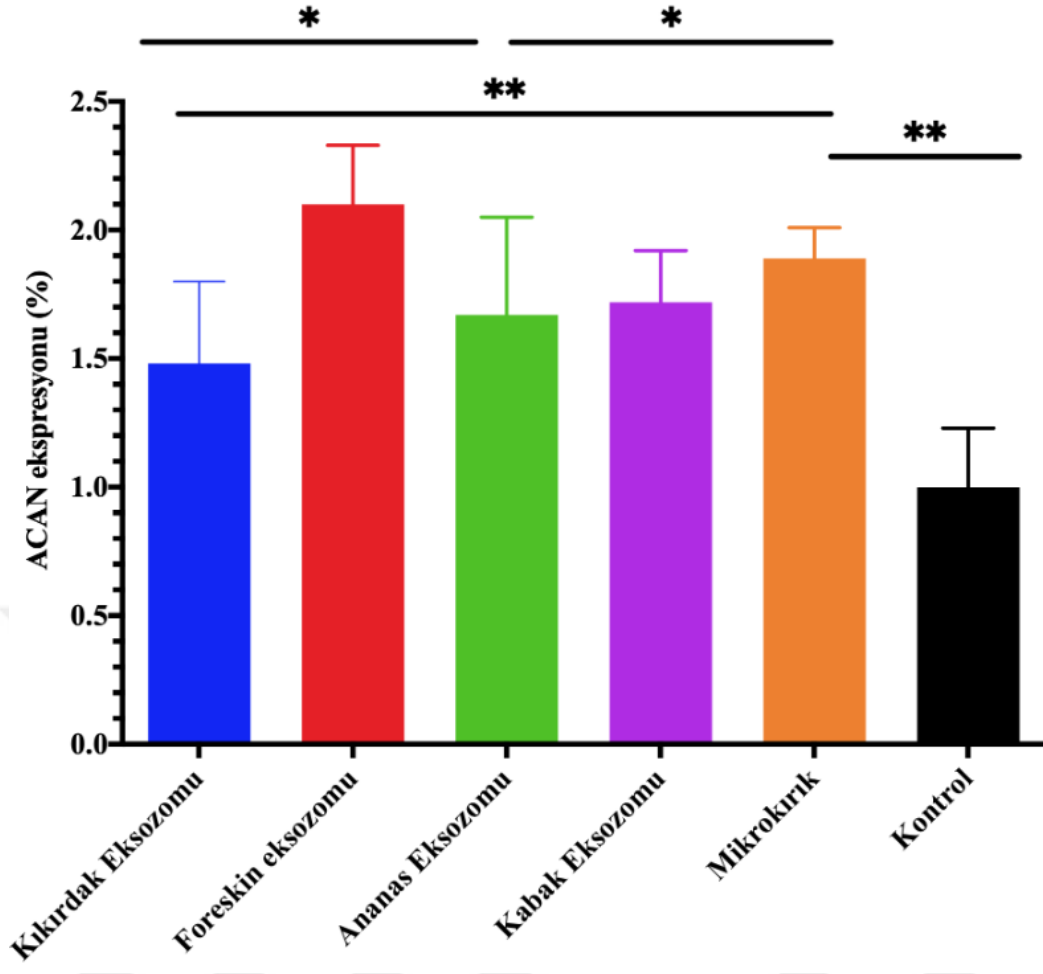
Alınan doku kesitlerinde embriyonik gelişim sırasında önem taşıyan ve özellikle iskelet gelişiminde transkripsiyon faktörü olarak adlandırılan SOX9 gen ekspresyonu, kıkırdak gelişiminde kondrositlerin tutunmasını ve matris oluşumuna destek görevi gören ekstrasellüler matris elemanları tip-II kollajen (COL-II) ve agregan (ACAN) gen ekspresyonlarının belirlenmesi için immünohistokimyasal boyama uygulandı. Dokulardan elde edilen kesitlerdeki ortalama yoğunluk düzeyleri gösterilmiştir. Her bir grubun negatif kontrol dokusunda herhangi bir ekspresyon gözlenmez iken SOX9 ekspresyonun belirlenmesi için ifade edildiği alan olan kondrosit hücrelerine bakıldı, COL-II ekspresyonunun belirlenmesi için bulunduğu bağ dokusu alanına bakılırken ACAN ekspresyonunun belirlenmesi için ise eksprese edildiği alan olan kondrositlerin laküna çevresi ve bağ dokusu alanları gözlemlendi.

SOX9, gen ekspresyonuna bakıldığı zaman kıkırdak eksozom grubunda, foreskin eksozom grubunda, ananas eksozom grubunda ve kabak eksozom grubunda ekspresyonunun artışı gözlenmektedir. Deney grupları kendi içerisinde karşılaştırıldığında kıkırdak eksozomu, foreskin eksozomu, ananas eksozomu ve kabak eksozomu Sox9 overekspresyonu açısından istatistiksel olarak farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$). Eksozom verilen grup ile mikrokirik grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$). Deney grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; kıkırdak eksozom grubunun ($p<0.001$), foreskin grubunun ($p<0.001$), ananas eksozom grubunun ($p<0.001$) ve kabak eksozom grubunun

($p < 0.001$) ortalama değerlendirme skorlarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır.

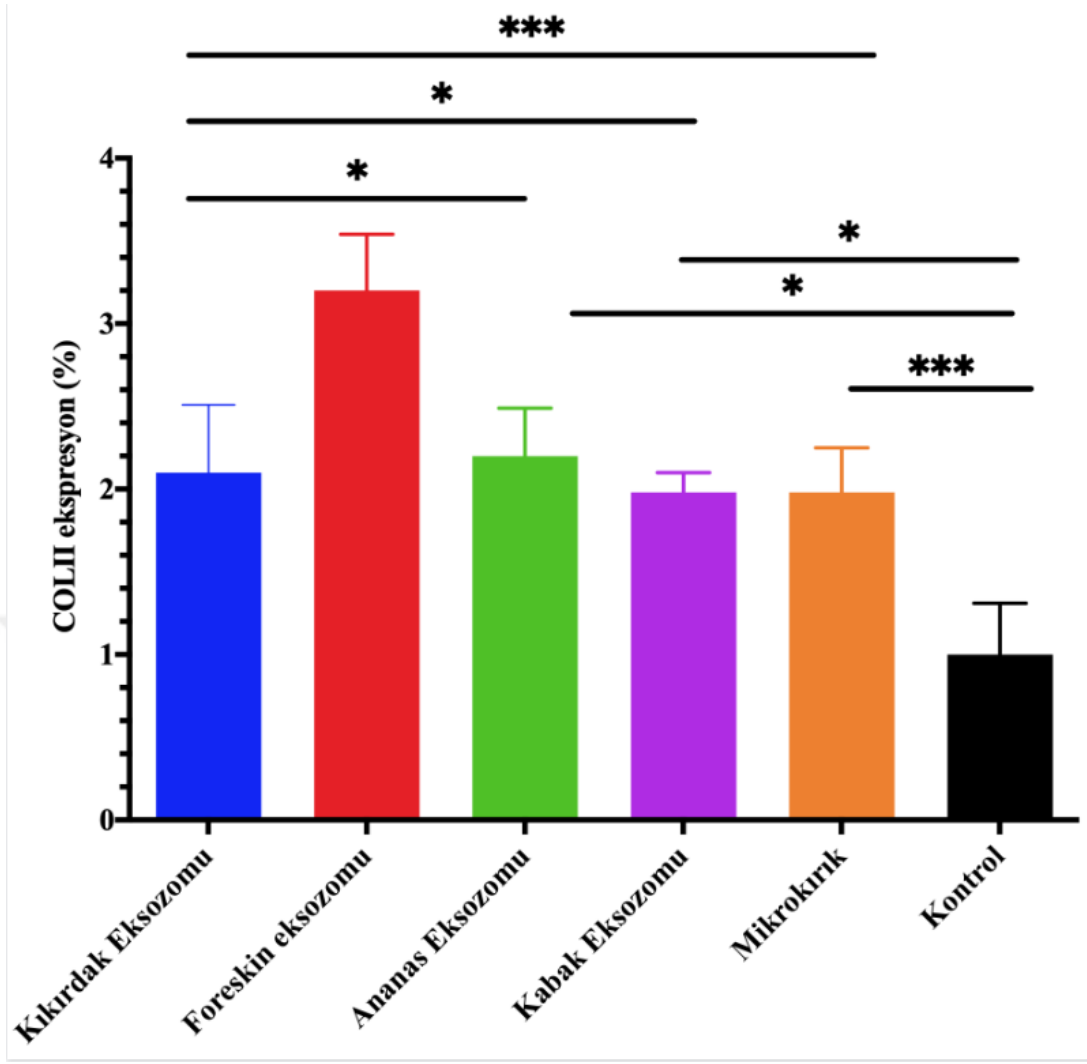


Tablo 8: Çalışma gruplarının Sox9 gen ekspresyonları



Tablo 9: Çalışma gruplarının ACAN gen ekspresyonları

ACAN gen ekspresyonuna bakıldığı zaman kıkırdak eksozom grubunda, foreskin eksozom grubunda, ananas eksozom grubunda ve kabak eksozom grubunda ekspresyonunun artışı gözlenmektedir. Deney gruplarından foreskin eksozom grubu diğer eksozom gruplarıyla kıyaslandığında istatistiksel olarak farklılık saptanmıştır ($p < 0.001$). Eksozom verilen grup ile mikrokırık grubu arasında ACAN ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p > 0.05$). Deney grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; kıkırdak eksozom grubunun ($p < 0.001$), foreskin grubunun ($p < 0.001$), ananas eksozom grubunun ($p < 0.001$) ve kabak eksozom grubunun ($p < 0.001$) ortalama değerlendirme skorlarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır.



Tablo 10: Çalışma gruplarının COL-II gen ekspresyonları

COL-II gen ekspresyonuna bakıldığı zaman kıkırdak eksozom grubunda, foreskin eksozom grubunda, ananas eksozom grubunda ve kabak eksozom grubunda ekspresyonunun artışı gözlenmektedir. Deney gruplarından foreskin eksozom grubu diğer eksozom gruplarıyla kıyaslandığında istatistiksel olarak farklılık saptanmıştır ($p < 0.001$). Eksozom verilen grup ile mikrokırık grubu arasında COL-II ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p > 0.05$). Deney grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; kıkırdak eksozom grubunun ($p < 0.001$), foreskin grubunun ($p < 0.001$), ananas eksozom grubunun ($p < 0.001$) ve kabak eksozom grubunun ($p < 0.001$) ortalama değerlendirme skorlarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır.

6. TARTIŞMA

Kıkırdak defektlerinin tedavisi için pek çok yöntem geliştirilmiş olmasına rağmen mevcut tedavi yöntemleri ile kaliteli ve kollajenden zengin kondrosit hücrelerinin diziliminin uygun olduğu bir kıkırdak elde etmek mümkün değildir. Tedavi yöntemlerinin başarısız olmasının altında iki önemli neden yatmaktadır, bunlardan birincisi kıkırdağın homojen olmayan yapısından kaynaklı kendisine has biyomekanik özelliklerinin taklit edilememesi ve avasküler, anöral ve hiposelüler bir doku olması nedeni ile hasara karşı yeterli bir yanıt verememesidir. Kıkırdakta oluşan geri dönüşümsüz hasar ağrı ve fonksiyon kaybına neden olacağı için yeni tedavi yöntemlerinin araştırılmasına ihtiyaç vardır. Biz de bu çalışmada deney hayvanında bir osteokondral defekt modeli oluşturduktan sonra, intraartiküler olarak eksozom tedavisi uygulayıp, eksozomların kıkırdak iyileşme potansiyellerini ortaya koymaya çalıştık. Çalışmanın subgruplarına baktığımızda ise, başlıca memeli ve bitki kaynaklı eksozomlar aracılığı ile türler arası etkileşimin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini gösterdik. Osteokondral defektlerde kullanılan mevcut tedavi yöntemlerinden biri olan mikrokirik uygulaması ile eksozom tedavisini karşılaştırarak, günlük pratikte intraartiküler eksozom tedavisinin başarılı bir şekilde uygulanabileceğini gösterdik. Literatüre baktığımız zaman eksozom kaynağı olarak kemik iliği kaynaklı kök hücreler, adipoz doku kaynaklı kök hücreler, kordon kanı kaynaklı kök hücreler ve sinovyal doku kaynaklı kök hücreler eksozom kaynağı olarak sıkça kullanılmaktadır. Biz çalışmamızda foreskin dokusundaki mezenkimal kök hücrelerden ve sağlıklı kıkırdak dokusundan elde ettiğimiz eksozomların kıkırdak iyileşmesi üzerine etkisini araştırdık.

Pek çok sayıda çalışma, osteokondral defekt oluşturulan hayvan modelleri aracılığıyla enjekte edilen eksozomların etkinliğini göstermiştir. Örneğin, Zhang ve ark (145) kritik boyutlu osteokondral kusurları olan sıçan modellerine haftalık olarak MSC eksozomları enjekte ettiler. Eksozomların, yüksek ekstrasellüler matriks oluşumu ile ameliyattan 2 hafta sonra onarımı başlattığını keşfettiler. Eksozomların in vitro floresan görüntülemesinde, kondrositler tarafından 24 saat içinde hızlı bir şekilde endositozlandığını ve 12 saatte maksimum yoğunluğa ulaştığını ortaya koydular. Yakın tarihlerde yapılmış bir başka çalışmada ise Chen ve arkadaşları (146) tarafından fare modelleri kullanılarak yapılan kondrosit eksozomları enjeksiyonlarında, eksozomların 12 hafta boyunca haftalık olarak enjekte edildiği ve bunların terapötik etkilerinin 4. hafta gibi erken bir tarihte gözlemlenebildiği rapor edilmiştir. Dolayısıyla, doğal hücreler tarafından eksozom tüketiminin hızlı olduğu sonucuna varılabilir. Bununla birlikte, eksozomlar yüksek konsantrasyonlarda sitotoksiste gösterebileceğinden, sıklığı azaltmak için yüksek dozda bir enjeksiyon uygulanmamalıdır (147). Bizde oluşturduğumuz modelde literatürle uyumlu olarak ameliyattan sonra eklem kapsülünün iyileşmesini takiben haftalık eksozom enjeksiyonlarına başladık. Her bir deneğe 3'er enjeksiyon yaptıktan sonra son enjeksiyondan 2 hafta sonra sakrifikasyon işlemini gerçekleştirdik. Yeni oluşacak kıkırdak dokusunun fibröz karakterde olmasına izin vermemek adına optimum zaman aralığına ulaşmayı hedefledik. Çünkü eksozomların kondrositler üzerine etki edip defektif sahaya migrasyonunu başlatmaları ile fibroblastların aynı bölgede fibröz kıkırdak oluşturmaları birbirine çok yakın zaman dilimleriyle ilişkilidir. Osteokondral defektin istenilen karakterde ekstrasellüler matriks ile dolması bu tedavi stratejilerinin ana amaçlarından biridir. Etyolojisi farketmeksizin meydana gelen defekt ya hiç iyileşmez ya da sert fibrotik doku ile kapatılır. Fibrokartilaj ile mekanik olarak iyileşme sağlanmış olur ancak fonksiyonel olarak çevre dokuyla uyumlu olmayan bir iyileşme meydana gelir (148). Fonksiyonel kaybın nedeni iyileşme dokusunda meydana gelen fibrokartilajın tip 1 kollajen içermesidir. Hyalin kıkırdak asıl olarak tip 2 kollajen ihtiva eder. Tip 1 kollajen eklem kayganlık, esneklik ve elastikiyet özelliğini kazandıramaz; mekanik aşınma kaçınılmaz sonuç olarak karşımıza çıkar (149).

Eksozomlar, üretildikleri hücreler tarafından serbest bırakıldıktan sonra, ilgili reseptörlere bağlanarak hedef hücreleri doğrudan aktive veya inhibe edebilirler. Hücreler arası iletişime ve gen düzenlemesine aracılık eden endositoz yoluyla genetik materyali fonksiyonel proteinlere aktarabilirler veya çevirebilirler, ve bunun sonucunda hücresel fonksiyonu değiştirebilirler (150). Hücresel etkileşimde yer alan bir sinyal molekülü olarak, eksozomlar ya eklem hasarının ilerlemesini yavaşlatabilirler ya da eklem kıkırdak onarımını teşvik edebilir (151). Spesifik olarak, terapötik hücreler, özellikle mezenkimal kök hücreler tarafından salgılanan eksozomlar, hasarlı doku ortamını düzenlemek ve sonraki rejeneratif süreci koordine etmek için biyoaktif maddelerini transfer ederek kıkırdak hasarının tedavisinde kullanılmak istenmektedir. Hücresel döngüyü bu kadar kuvvetli manipüle eden bu küçük kargoların istenilen etkilerinin yanında istenmeyen etkilerinin varlığında sorgulanmaktadır. Ancak hücresel tedavilerden sonra konakçının hücreye verdiği yanıt ve hücrenin konakçıya karşı verdiği tepkiler immünolojik ve onkolojik endişeleri akıllara getirmiştir. Eksozomların kullanımı, hücresel tedavilere göre daha yüksek güvenlik profili, daha düşük immünojenisite ve doğrudan tümör oluşturmama nedeniyle hücresel muadillerine göre önemli avantajlar sunmaktadır (152). Bizde çalışmamızda histolojik olarak çıkarılan materyalleri incelediğimizde sağlıklı dokuların hiçbirinde hipertrofi ile karşılaşmadık ancak takip süresinin kısa olması nedeniyle onkogenetik bir süreç hakkında uzun süreli sağlıklı bir veri elde edemedik.

Tam olarak aydınlatılamayan ve halen araştırılmakta olan konulardan biriside farklı hücre tiplerinden gelen eksozomların farklı etkilere sahip olmasıdır. Zhu ve arkadaşları osteoartrit tedavisinde sinovyal membran kaynaklı mezenkimal kök hücre tarafından salgılanan eksozomlar ile uyarılmış pluripotent kök hücre tarafından salgılanan eksozomların etkilerini karşılaştırmışlardır (153). Oluşturdukları fare modelinde her iki eksozomun da osteoartriti azalttığını bulmuşlar, ancak uyarılmış pluripotent kaynaklı eksozomların, kondrosit göçü ve in vitro proliferasyon üzerinde daha güçlü bir etkisi olduğunu tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada, Chen ve arkadaşları, kondrositlerden türetilen eksozomların kollajen birikimini arttırdığını ve tasarlanmış yapılarda vasküler büyümeyi en aza indirdiğini, verimli ve tekrarlanabilir bir şekilde kıkırdak geliştirdiğini, tedavi edilen doku mühendisliği yapısının ise hipertrofi ile karakterize edildiğini bulmuşlar. (146). In vitro olarak eksozomlar kıkırdak progenitör hücre proliferasyonunu uyarabilir ve mRNA ve protein seviyelerinde kondrojenez ile ilgili faktörleri önemli ölçüde teşvik edebilirler.

Osteokondral defekt oluşturulan pek çok prelinik modelde farklı hücre kaynaklarından elde edilen eksozomlar ile istenilen kondral iyileşmenin sağlandığı tespit edilmiştir(154). Bu kondral tamir sürecinin altındaki fizyopatolojik mekanizmada apoptozun inhibisyonu, hücre göçünü ve proliferasyonun artışı olduğu ve bu etkilere eksozomun doğrudan etki ettiği gösterilmiştir (155). Daha önce yara iyileşmesi modelinde kullanılan sünnet derisi kaynaklı kök hücrelerden elde edilen eksozomların yara iyileştirici etkisini hücrelerde hücre göçünü, yeni damar oluşumunu, enflamasyon cevabını ve çoğalmayı tetikleyerek etki ettiği gösterilmiştir (156). Bu çalışmada eksozom verilen gruplarda kontrol grubuna kıyasla artan hücre göçü ve çoğalması, yeni damar oluşumunun indüklenmesi, çoğalma ile ilgili büyüme faktörlerinin gen seviyelerinde artış ve ilgili sinyal yolağı proteinlerindeki değişim gösterilmiştir. Hücre hareketlerinin altında yatan muhtemel moleküler mekanizmalar, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolu ile ilişkilendirilmiştir. Bizim çalışmamızda da eksozom grupları arasında yer alan sünnet derisi kaynaklı kök hücreden izole edilen eksozomlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kıkırdak iyileşmesinde anlamlı derecede olumlu etki göstermişlerdir.

Bununla birlikte çalışmamızda bazı sınırlamalar mevcuttur. Öncelikle çalışmamız insan

kıkırdığı üzerinde değil, denek hayvan kıkırdığı üzerinde yapılabilmektedir. Ancak biyolojik görüntüsü insan kıkırdığına benzer özellikler göstermesi ve yoğun kondrosit içeriği sebebi ile hızlı iyileşme göstermesi açısından denek hayvanı olarak kullanılan sıçanlar çalışmaya uygunluk göstermektedir. Sıçanların hızlı metabolizmaları, bakım kolaylığı ve immün yanıtlarının insan kadar kuvvetli olmaması ve en az maliyetli olması bakımından pek çok çalışmada kullanılmaktadır. Bir diğer kısıtlılık ise deney hayvanlarındaki osteokondral defekt alanı, çoğu insan doğasının aksine kronik değil de akut olarak oluşturulmuştur. Bu da sıçanda oluşturulan kıkırdak defekt modelini insanda oluşanın aksine daha az benzer yapmaktadır. Ancak yine de literatüre bakıldığında bu tarz tüm çalışmaların benzer şekilde başladığı ve yapıldığı düşünüldüğünde bu sınırlamalar göz ardı edilebilir.

Mezenşimal kök hücreden türetilen eksozom tedavisi, çeşitli hastalıkların, özellikle de inflamatuvar bileşeni olan hastalıkların tedavisi için umut verici bir strateji olarak ortaya çıkmaktadır (157). Genetik materyali taşıma, hücre dışı bozulmadan koruma ve alıcı hücelere oldukça seçici bir şekilde iletme konusundaki doğuştan gelen yetenekleri, MSC'den türetilen eksozomların, kanser ve potansiyel olarak rejeneratif tıp için gen terapilerinin yanı sıra küçük moleküller için ideal bir dağıtım sistemi olduğunu düşündürmektedir (158). Bunlara ek olarak, cesaret verici klinik öncesi veriler, MSC'den türetilen eksozom terapötiklerinin, güvenlik ve çok yönlülük açısından hücre bazlı terapiden daha üstün olabileceğini göstermektedir (159, 160). Bununla birlikte, klinik kullanımlarını optimize etmek için kritik teknik hususlar ve olası yan etkilerin belirlenmesi mutlaka ele alınmalıdır (160). Ayrıca, biyomühendislik ve hücresel modifikasyon tekniklerinin hızlı ilerlemesiyle, eksozom alanındaki bir sonraki adım, eksozom yüzeyinin ve içeriğinin mühendisliği veya modifikasyonu olacaktır; bu, eksozom kullanımlarını hem tanısı konulmamış hastalıklarda biyobelirteç olarak hem de mekanizması anlaşılamamış fizyopatolojik süreçleri aydınlatma konusunda önümüzdeki süreçte karşımıza çıkaracaktır.

7. SONUÇ

Sonuç olarak çalışmamızda ratlarda deneysel osteokondral defekt modelinde eklem içi eksozom uygulamasının kıkırdak iyileşmesi üzerine makroskopik, histolojik ve genetik olarak olumlu etkilerinin olduğu görülmüştür. Eksozom uygulaması kontrol grubuna kıyaslandığında, yeni oluşan tamir dokusunun histolojik açıdan orijinal kıkırdığa daha çok benzeyen, etraf dokuyla daha uyumlu, biyomekanik olarak daha kuvvetli ve daha organize bir yapı olduğu görülmüştür. Bu verilerin ışığı altında, insandaki kıkırdak hasarını daha gerçekçi yansıtmak adına ratlarda oluşturduğumuz bu modeli daha fazla sayıda ve daha büyük deney hayvanlarında planlayarak kıkırdak hasarının tedavisini geliştirmeye yönelik çalışmalar yapılmalıdır.

8.KAYNAKLAR

- 1-Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health*. 2009; 1: 461-68.
- 2-Chubinskaya S, Malfait A-M, Wimmer MA. Forum and Function of Articular Cartilage. In : O’Keefe RJ, American Academy of Orthopaedic S, editors. *Orthopaedic Basic Science: Foundations of Clinical Practice*. 4th Edition ed. Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 2013. P. 183-97.
- 3-Carballo CB, Nakagawa Y, Sekiya I, Rodeo SA. Basic Science of Articular Cartilage. *Clin Sports Med*. 2017; 36: 413-25
- 4-Stoddart MJ, Grad S, Eglin D, Alini M. Cells and biomaterials in cartilage tissue engineering. *Regen Med*. 2009; 4: 81-98
- 5-Wang Y, Wei L, Zeng L, He D, Wei X. Nutrition and degeneration of articular cartilage. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2013; 21: 1751-62.
- 6-Mankin HJ, Mow VC, Buckwalter JA, Iannotti JP, Ratcliffe A. Articular cartilage structure, composition and function. In: Buckwalter JA, Einhorn TA, Simon SR (eds). *Orthopaedic Basic Science: Biology and Biomechanics of the Musculoskeletal System*. 2nd Edition. American Academy of Orthopaedic Surgeons. 2000: 443–470
- 7-Wong M, Carter DR. Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: a research perspective. *Bone* 2003;33:1-13.
- 8-Mow VC, Sugalski MT. Physiology of synovial joints and articular cartilage. In: Gonzales Eg, Myers SJ, Edelstein JE, Lieberman JS, Downey JA (Eds): *Physiological Basis of Rehabilitation Medicine*. 3rd ed. Butterworth- Heinemann, Woburn, 2001; 133-168.
- 9-Sdfs Flik KR, Verma N, Cole BJ BB. Articular Cartilage. In: Williams RJ (ed) *Cartilage Repair Strategies* First edition USA, New Jersey: Humana Press Inc. 2007; . 1–12.
- 10-Kovach I S. A molecular theory of cartilage viscoelasticity. *Biophysical chemistry* 59.1-2 1996; 61-73.
- 11-Eyre D. Articular cartilage and changes in arthritis: collagen of articular cartilage. *Arthritis Research & Therapy* 4.1 2001; 30
- 12-Stranding S, Wigley C. Introduction and systemic overview: Functional anatomy of the musculoskeletal system. In: Stranding S, Ellis H, Healy JC, Johnson D, Williams A (eds) *Gray’s Anatomy*, 39th Edition: *The Anatomical Basis of Clinical Practice*. 2005. p. 83-134.
- 13-Hayes DW Jr, Brower RL, John KJ. Articular cartilage. Anatomy, injury, and repair. *Clin Podiatr Med Surg*. 2001 Jan;18(1):35-53.
- 14-Graf, J., Neusel, E., Schneider, E. & Niethard, F. U. Intra-articular treatment with hyaluronic acid in osteoarthritis of the knee joint: a controlled clinical trial versus mucopolysaccharide polysulfuric acid ester. *Clin. Exp. Rheumatol*. 11, 367–72
- 15-Kierszenbaum AL, Tres L. *Histology and Cell Biology*. London: Elsevier Health Sciences; 2015.
- 16-Armiento AR, Stoddart MJ, Alini M, Eglin D. Biomaterials for articular cartilage tissue engineering: Learning from biology. *Acta Biomater*. 2018 Jan;65:1-20.

- 17-Kjashk Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Lavery S. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *ClinOrthopRelat Res*. 2001;(391 Suppl): 26-33.
- 18-Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte matrix interactions. *Instr Course Lect, J Bone Joint Surg Am*. 1997;79-A(4): 600- 611.
- 19-Alford JW, Cole BJ. Cartilage restoration, part 1: basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options. *Am J Sports Med*. 2005;33(2): 295-306.
- 20-Stranding S, Wigley C. Introduction and systemic overview: Functional anatomy of the musculoskeletal system. In Stranding S, Ellis H, Healy JC, Johnson D, Williams A (eds). *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*. 39th edition. USA, Philadelphia: Elsevier. 2005: 83-134.
- 21-Ulrich-Vinther M, Maloney MD, Schwarz EM, Rosier R, O'Keefe RJ. Articular cartilage biology. *J Am AcadOrthop Surg*. 2003;11(6): 421-430.
- 22-Bhosale AM, Richardson JB. Articular cartilage: structure, injures and review of management. *British Medical Bulletin*. 2008; 1: 1-19.
- 23-Lee JH, Kisiday J, Grodzinsky AJ. Tissue-engineered versus native cartilage: linkage between cellular mechano-transduction and biomechanical properties. In: Bock G, Groode J (Eds): *Tissue Engineering of Cartilage and Bone*. Wiley, Chichester (Novartis Foundation Symposium 249), 2003, pp 52-69
- 24-Wong M, Carter DR. Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: a research perspective. *Bone* 2003;33:1-13.
- 25-Tatari H. The structure, physiology, and biomechanics of articular cartilage: injury and repair. *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica*. 2007;41.2:1-5
- 26-Lin Z, Willers C, Xu J, Zheng MH. The chondrocyte: biology and clinical application. *Tissue engineering*. 2006;12.7:1971-84.
- 27-Buckwalter J A, Mankin H J. Articular cartilage repair and transplantation. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology* 41.8 1998: 1331-42
- 28-Skinner H B, Patrick J. *Current diagnosis & treatment in orthopedics*. California: Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2006.
- 29-Eyre DR, Wu JJ, Woods PE. The cartilage collagens: Structural and metabolic studies. *J Rheumatol*. 1991; (suppl 27)18: 49–51.
- 30-Williams III RJ. *Cartilage Repair Strategies*. Humana Press Inc, Totowa, New Jersey, 2007, pp. 1-12.
- 31-Mollenhauer JA. Perspectives on articular cartilage biology and osteoarthritis. *Injury*. 2008;39 Suppl 1:S5-12.
- 32-Tyyni A, Karlsson J. Biological treatment of joint cartilage damage. *Scand J Med Sci Sports*. 2000; 10(5): 249-265.
- 33-Decker, R. S., Koyama, E. & Pacifici, M. Articular Cartilage: Structural and Developmental Intricacies and Questions. *Curr. Osteoporos. Rep.* 2015; 13, 407–414.

- 34-Namiki, O., Toyoshima, H. & Morisaki, N. Therapeutic effect of intraarticular injection of high molecular weight hyaluronic acid on osteoarthritis of the knee. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* 1982; 20, 501–7.
- 35-Grecomoro, G., Piccione, F. & Letizia, G. Therapeutic synergism between hyaluronic acid and dexamethasone in the intra-articular treatment of osteoarthritis of the knee: a preliminary open study. *Curr. Med. Res. Opin.* 1992; 13, 49–55.
- 36-Hunziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2001;10: 432–463.
- 37-O'Driscoll SW. Current concepts review- the healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*. 1998;80: 1795-1812.
- 38-Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*. 1994;76(4): 579-592.
- 39-Mankin HJ. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am*. 1982;64(3): 460-466.
- 40-Buckwalter JA, Lohmander S. Operative treatment of osteoarthrosis. Current practice and future development. *J Bone Joint Surg Am*. 1994;76(9): 1405-1418
- 41-Gobbi A, Karnatzikos G, Mahajan V, Malchira S. Platelet-rich plasma treatment in symptomatic patients with knee osteoarthritis: preliminary results in a group of active patients. *Sports Health*. 2012;4(2): 162-172
- 42-Newman AP. Articular cartilage repair. *Am J Sports Med*. 1998 Mar-Apr;26(2):309-24.
- 43-Rambani R, Venkatesh R. Current concepts in articular cartilage repair *J. Arthrosc. Joint Surg*, 1 2014, pp. 59-65
- 44-Beris AE, Lykissas MG, Papageorgiou CD, Georgoulis AD. Advances in articular cartilage repair. *Injury*. 2005 Nov;36 Suppl 4:S14-23.
- 45-Outerbridge RE. The etiology of chondromalacia patellae. *J Bone Joint Surg Br*. 1961;43-B:752–7
- 46-Brittberg M, Winalski CS. Evaluation of cartilage injuries and repair. In: *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A*. 2003. p. 58–69
- 47-Rodriguez-Merchan EC. Regeneration of articular cartilage of the knee. *Rheumatol Int*. 2013;33(4):837–45.
- 48-Makris EA, Gomoll AH, Malizos KN, Hu JC, Athanasiou KA. Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. Vol. 11, *Nature Reviews Rheumatology*. 2015. p. 21–34.
- 49-Nukavarapu SP, Dorcenus DL. Osteochondral tissue engineering: Current strategies and challenges. Vol. 31, *Biotechnology Advances*. 2013. p. 706–21.
- 50-Magnuson PB. Eklemler debridmanı, dejeneratif artrit cerrahi tedavisi, *Surg Jinekoloji Obstet*. 1941; 73: 1-9.
- 51-Ike R, Arnold W. Arthroscopic lavage of osteoarthritic knees. *J Bone Jt Surg - Ser B*. 1992;74(5):788–9.
- 52-Lotz M. Cytokines in cartilage injury and repair. *Clin Orthop Relat Res*. 2001; 391(Suppl.): 108–15

- 53-Rodrigo JJ, Steadman JR, Silliman JF, Fulstone HA. Sürekli pasif hareket kullanılarak debridman ve mikrokırık sonrası insan dizinde tam kalınlıkta kondral defekt iyileşmesinin iyileştirilmesi, *Am J Diz Cerrahisi*. 1994; 7: 109- 116.
- 54-Koga H, Engebretsen L, Brinchmann JE, Muneta T, Sekiya I. Mesenchymal stem cell-based therapy for cartilage repair: a review. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2009; 17: 1289–97.
- 55-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.
- 56-Bhosale AM, Richardson JB. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull*. 2008; 87: 77-95
- 57-Hoemann CD, Hurtig M, Rossomacha E, Sun J, Chevrier A, Shive MS, et al. Chitosan-glycerol phosphate/blood implants improve hyaline cartilage repair in ovine microfracture defects. *J Bone Joint Surg*. 2005; 87: 2671-86.
- 58-Zantop T, Petersen W. Arthroscopic implantation of a matrix to cover large chondral defect during microfracture. *Arthroscopy*. 2009; 25: 1354-60.
- 59-Mithoefer K, Williams RJ 3rd, Warren RF, Potter HG, Spock CR, Jones EC, et al. Chondral resurfacing of articular cartilage defects in the knee with the microfracture technique. Surgical technique. *J Bone Joint Surg*. 2006; 88 Suppl 1 Pt 2: 294-304.
- 60-Steadman JR, Rodkey WG, Rodrigo JJ. Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin Orthop Relat Res*. 2001; (391 Suppl): S362-9.
- 61-Cole BJ, Lee SJ. Complex knee reconstruction: articular cartilage treatment options. *Arthroscopy*. 2003; 19 Suppl 1: 1-10.
- 62-Matsusue Y, Yamamuro T, Hama H. Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption. *Arthroscopy*. 1993; 9: 318-21.
- 63-Hangody L, Kish G, Kárpáti Z, Szerb I, Udvarhelyi I. Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condylar articular defects. A preliminary report. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 1997; 5: 262-7.
- 64-Hangody L, Kish G, Kárpáti Z, Szerb I, Eberhardt R. Treatment of osteochondritis dissecans of the talus: use of the mosaicplasty technique-a preliminary report. *Foot Ankle Int*. 1997; 18: 628-34
- 65-Marcacci M, Kon E, Zaffagnini S, Iacono F, Neri MP, Vascellari A, et al. Multiple osteochondral arthroscopic grafting (mosaicplasty) for cartilage defects of the knee: prospective study results at 2-year follow-up. *Arthroscopy*. 2005; 21: 462-70.
- 66-Pearce SG, Hurtig MB, Clarnette R, Kalra M, Cowan B, Miniaci A. An investigation of 2 techniques for optimizing joint surface congruency using multiple cylindrical osteochondral autografts. *Arthroscopy*. 2001; 17: 50-5.
- 67-Gross AE. Repair of cartilage defects in the knee. *J Knee Surg*. 2002; 15: 167-9.
- 68-Thaunat M, Couchon S, Lunn J, Charrois O, Fallet L, Beaufils P. Cartilage thickness matching of selected donor and recipient sites for osteochondral autografting of the medial femoral condyle. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2007; 15: 381-6
- 69-Cole BJ, Lee SJ. Complex knee reconstruction: articular cartilage treatment options. *Arthroscopy*. 2003;19 Suppl 1: 1-10.

- 70-Coons DA, Barber FA. Arthroscopic osteochondral autografting. *Orthop Clin North Am.* 2005; 36: 447-58.
- 71-Gross AE. Cartilage resurfacing: filling defects. *J Arthroplasty.* 2003; 18(3 Suppl 1): 14-7.
- 72-Hangody L, Kish G, Kárpáti Z, Udvarhelyi I, Szigeti I, Bély M. Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: application in clinical practice *Orthopedics.* 1998; 21: 751-6.
- 73-Buckwalter JA. Articular cartilage injuries. *Clin Orthop Relat Res.* 2002; 402: 21-37.
- 74-Zantop T, Petersen W. Arthroscopic implantation of a matrix to cover large chondral defect during microfracture. *Arthroscopy.* 2009; 25: 1354-60.
- 75-Arøen A, Heir S, Løken S, Engebretsen L, Reinholt FP. Healing of articular cartilage defects. An experimental study of vascular and minimal vascular microenvironment. *J Orthop Res.* 2006; 24: 1069-77.
- 76-Chesterman, P. J. & Smith, A. U. Homotransplantation of articular cartilage and isolated chondrocytes. An experimental study in rabbits. *J. Bone Joint Surg. Br.* 1968; 50, 184-97
- 77-Bentley, G. & Greer, R. B. Homotransplantation of isolated epiphyseal and articular cartilage chondrocytes into joint surfaces of rabbits. *Nature* 1971; 230, 385-8.
- 78-Peterson, L., Minas, T., Brittberg, M. & Lindahl, A. Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation: results at two to ten years. *J. Bone Joint Surg. Am.* 2003; 85-A Suppl, 17-24.
- 79-Dozin, B. et al. Comparative evaluation of autologous chondrocyte implantation and mosaicplasty: a multicentered randomized clinical trial. *Clin. J. Sport Med.* 2005 15, 220-6.
- 80-Roberts S, McCall IW, Darby AJ. Kıkırdak onarımı için otolog kondrosit implantasyonu: manyetik rezonans görüntüleme ve histoloji ile başarısının izlenmesi, *Artrit Res Ther.* 2003; 5: 60-73.
- 81-Wood, J. J. et al. Autologous cultured chondrocytes: adverse events reported to the United States Food and Drug Administration. *J. Bone Joint Surg. Am.* 2006; 88, 503-7
- 82-Zaslav, K. 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.
- 83-Niemeyer, P. et al. Characteristic complications after autologous chondrocyte implantation for cartilage defects of the knee joint. *Am. J. Sports Med.* 2008; 36, 2091-9.
- 84-Marcacci M, Kon E, Zaffagnini S, Filardo G, Delcogliano M, Neri MP, et al. Arthroscopic second generation autologous chondrocyte implantation. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2007; 15: 610-9.
- 85-Selmi TA, Verdonk P, Chambat P, Dubrana F, Potel JF, Barnouin L, et al. Autologous chondrocyte implantation in a novel alginate-agarose hydrogel: outcome at two years. *J Bone Joint Surg [Br]* 2008; 90: 597-604
- 86-Iwasa J, Engebretsen L, Shima Y, Ochi M. Clinical application of scaffolds for cartilage tissue engineering. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2009; 17: 561-77
- 87-Gikas PD, Bayliss L, Bentley G, Briggs TW. An overview of autologous chondrocyte implantation. *J Bone Joint Surg.* 2009; 91: 997-1006

- 88-Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, Hsu HP, Minas T, Shortkroff S, et al. Chondrocyte-seeded collagen matrices implanted in a chondral defect in a canine model. *Biomaterials*. 1998; 19: 2313-28
- 89-Vanlauwe J, Almqvist F, Bellemans J, Huskin JP, Verdonk R, Victor J. Repair of symptomatic cartilage lesions of the knee: the place of autologous chondrocyte implantation. *Acta Orthop Belg*. 2007; 73: 145-58.
- 90-Manfredini M, Zerbinati F, Gildone A, Faccini R. Autologous chondrocyte implantation: a comparison between an open periosteal-covered and an arthroscopic matrix-guided technique. *Acta Orthop Belg*. 2007; 73: 207-18.
- 91-Bartlett W, Skinner JA, Gooding CR, Carrington RW, Flanagan AM, Briggs TW, et al. Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee: a prospective, randomised study. *J Bone Joint Surg*. 2005; 87: 640-5.
- 92-Matrix guided autologous chondrocyte implantation in treatment of cartilage injuries TOTBİD Dergisi. 2010; 9: 164-174.
- 93-Bedi A, Feeley BT, Williams RJ. Management of articular cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg Am*. 2010;92: 994-1009.
- 94-Haene R, Qamirani E, Story RA, Pinsker E, Daniels TR. Intermediate outcomes of fresh talar osteochondral allografts for treatment of large osteochondral lesions of the talus. *J Bone Joint Surg Am*. 2012;94(12): 1105-1110.
- 95-Volesky M, Charlton T, Deland JT. Articular cartilage repair strategies in the ankle joint. In Williams RJ (ed). *Cartilage Repair Strategies*. First edition. USA, New Jersey: Humana Press Inc. 2007: 283-309
- 96-Doral MN, Atay ÖA, Bilge O, Dönmez G, Üzümcügil A, Olgun D, Ayvaz M, Kaya D. Kıkırdak Tamirinde Güncel Cerrahi Yaklaşımlar. *Türk Geriatri Dergisi*. 2011; Özel Sayı 1: 95-100
- 97-Darling, E. M. & Athanasiou, K. A. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *J. Orthop. Res.*2005; 23, 425–32.
- 98-Hidaka, C., Cheng, C., Alexandre, D., Bhargava, M. & Torzilli, P. A. Maturation differences in superficial and deep zone articular chondrocytes. *Cell Tissue Res.*2006; 323, 127–35.
- 99-Bryant, S. J. & Anseth, K. S. Controlling the spatial distribution of ECM components in degradable PEG hydrogels for tissue engineering cartilage. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2003; 64, 70–9 .
- 100-Ma Q, Liao J, Cai X. Different Sources of Stem Cells and their Application in Cartilage Tissue Engineering. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2018;13(7):568-575.
- 101-Huang K, Li Q, Li Y, Yao Z, Luo D, Rao P, Xiao J. Cartilage Tissue Regeneration: The Roles of Cells, Stimulating Factors and Scaffolds. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2018;13(7):547-567.
- 102-Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *British journal of haematology*. 1967;13(3):269–88.
- 103-Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. Vol. 4, *Journal of Extracellular Vesicles*. Co-Action Publishing; 2015. p. 1–60.
- 104-Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 2013 Feb 18;200(4):373-83

- 105-Abels ER, Breakefield XO. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell Mol Neurobiol.* 2016 Apr;36(3):301-12
- 106-Yates AG, Pink RC, Erdbrügger U, Siljander PR, Dellar ER, Pantazi P, Akbar N, Cooke WR, Vatish M, Dias-Neto E, Anthony DC, Couch Y. In sickness and in health: The functional role of extracellular vesicles in physiology and pathology in vivo: Part I: Health and Normal Physiology: Part I: Health and Normal Physiology. *J Extracell Vesicles.* 2022 Jan;11(1):e12151.
- 107-Ogorevc E, Kralj-Iglic V, Veranic P. The role of extracellular vesicles in phenotypic cancer transformation . Vol. 47, *Radiology and Oncology.* Association of Radiology and Oncology; 2013. p. 197–205
- 108-Tricarico C, Clancy J, D'Souza-Schorey C. Biology and biogenesis of shed microvesicles. *SmallGTPases.*2017;8(4):220-232.
- 109-Choi DS, Kim DK, Kim YK, Gho YS. Proteomics of extracellular vesicles: exosomes and ectosomes. *Mass Spectrometry Reviews.* JulY Aug 2015; 34(4):474-90.
- 110-Vader P, Mol EA, Pasterkamp G, Schiffelers RM. Extracellular vesicles for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2016; 106, 148-156.
- 111-Akers, J. C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S., Chen, C. C. (2013). Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *Journal of neuro-oncology*, 113(1), 1-11.
- 112-Jing X, Robert C, Sharon M. Gorski; The interplay between exosomes and autophagy – partners in crime. *J Cell Sci* 2018; 131 (15)
- 113-Willem Stoorvogel, Ger J. Strous, Hans J. Geuze, Viola Oorschot, Alan L. Schwartz, Late endosomes derive from early endosomes by maturation, *Cell*, Volume 65, Issue 3, 1991,
- 114-Hessvik, N.P. and Llorent, A. (2018) Current Knowledge on Exosome Biogenesis and Release. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75, 193-208.
- 115-Lobasso Simona, Tanzarella Paola, Mannavola Francesco, Tucci Marco, Silvestris Francesco, Felici Claudia, Ingrosso Chiara, Corcelli Angela, Lopalco Patrizia A Lipidomic Approach to Identify Potential Biomarkers in Exosomes From Melanoma Cells With Different Metastatic Potential, *Frontiers in Physiology*, 2021 vol 12.
- 116-Frydrychowicz M, Kolecka-Bednarczyk A, Madejczyk M, Yasar S, Dworacki G. Exosomes - structure, biogenesis and biological role in non-small-cell lung cancer. *Scand J Immunol.* 2015;81(1):2-10.
- 117-Edgar JR. Q&A: What are exosomes, exactly?. *BMC Biol.* 2016;14:46.
- 118-Kowal J, Tkach M, Théry C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol.* 2014;29:116-125
- 119-Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, et al. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol.* 2012;14(7):677-685.
- 120-Moloudizargari M, Asghari MH, Abdollahi M. Modifying exosome release in cancer therapy: How can it help?. *Pharmacol Res.* 2018;134:246-256.
- 121-Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, et al. ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *J Mol Biol.* 2016;428(4):688-692.

- 122-Kourembanas S. Exosomes: vehicles of intercellular signaling, biomarkers, and vectors of cell therapy. *Annu Rev Physiol.* 2015;77:13-27.
- 123-Olga J, Regina H, Alena S, et al. Conventional and Nonconventional Sources of Exosomes-Isolation Methods and Influence on Their Downstream Biomedical Application. *Front Mol Biosci.* 2022;9:846650
- 124-Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO, Lai CP. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience.* 2015;65(8):783-797
- 125-French KC, Antonyak MA, Cerione RA. Extracellular vesicle docking at the cellular port: Extracellular vesicle binding and uptake. *Semin Cell Dev Biol.* 2017;67:48-55.
- 126-Schorey JS, Bhatnagar S. Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. *Traffic.* 2008;9(6):871-881
- 127-Behera J, Tyagi N. Exosomes: mediators of bone diseases, protection, and therapeutics potential. *Oncoscience.* 2018;5(5-6):181-195
- 128-H Rashed M, Bayraktar E, K Helal G, et al. Exosomes: From Garbage Bins to Promising Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci.* 2017;18(3):538
- 129-Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9(6):654-659.
- 130-Yin P, Lv H, Li Y, Deng Y, Zhang L, Tang P. Exosome-Mediated Genetic Information Transfer, a Missing Piece of Osteoblast-Osteoclast Communication Puzzle. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017;8:336.
- 131-Guay C, Regazzi R. Exosomes as new players in metabolic organ cross-talk. *Diabetes Obes Metab.* 2017;19 Suppl 1:137-146.
- 132-Horibe S, Tanahashi T, Kawauchi S, Murakami Y, Rikitake Y. Mechanism of recipient cell-dependent differences in exosome uptake. *BMC Cancer.* 2018;18(1):47.
- 133-Zhang G, Yang P. A novel cell-cell communication mechanism in the nervous system: exosomes. *J Neurosci Res.* 2018;96(1):45-52.
- 134-Guo W, Gao Y, Li N, et al. Exosomes: New players in cancer (Review). *Oncol Rep.* 2017;38(2):665-675
- 135-McMahon HT, Boucrot E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(8):517-533.
- 136-Fitzner D, Schnaars M, van Rossum D, et al. Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *J Cell Sci.* 2011;124(Pt 3):447-458
- 137-Dreyer F, Baur A. Biogenesis and Functions of Exosomes and Extracellular Vesicles. *Methods Mol Biol.* 2016;1448:201-216
- 138-Boriachek K, Islam MN, Möller A, et al. Biological Functions and Current Advances in Isolation and Detection Strategies for Exosome Nanovesicles. *Small.* 2018;14(6)
- 139-Barros FM, Carneiro F, Machado JC, Melo SA. Exosomes and Immune Response in Cancer: Friends or Foes?. *Front Immunol.* 2018;9:730.

- 140-B. J. Crenshaw, B. Sims, and Q. L. Matthews, Biological Function of Exosomes as Diagnostic Markers and Therapeutic Delivery Vehicles in Carcinogenesis and Infectious Diseases, *Nanomedicines* (2019): n. pag.
- 141-Properti F, Logozzi M, Fais S. Exosomes: the future of biomarkers in medicine. *Biomark Med.* 2013;7(5):769-778.
- 142-N. Kumar, *International Journal of Bioassays*, vol. 3, 2014 3435-3437
- 143-Saad MG, Beyenal H, Dong WJ. Exosomes as Powerful Engines in Cancer: Isolation, Characterization and Detection Techniques. *Biosensors (Basel)*. 2021;11(12):518
- 144-Jing H, He X, Zheng J. Exosomes and regenerative medicine: state of the art and perspectives. *Transl Res.* 2018;196:1-16
- 145- Wong KL, Zhang S, Wang M, et al. Intra-Articular Injections of Mesenchymal Stem Cell Exosomes and Hyaluronic Acid Improve Structural and Mechanical Properties of Repaired Cartilage in a Rabbit Model. *Arthroscopy*. 2020;36(8):2215-2228.e2.
- 146-Chen, Y., Xue, K., Zhang, X. et al. Exosomes derived from mature chondrocytes facilitate subcutaneous stable ectopic chondrogenesis of cartilage progenitor cells. *Stem Cell Res Ther* 9, 318 (2018).
- 147-Rosenberger, L., Ezquer, M., Lillo-Vera, F. et al. Stem cell exosomes inhibit angiogenesis and tumor growth of oral squamous cell carcinoma. *Sci Rep* 9, 663 (2019).
- 148-Chen YS, Lin EY, Chiou TW, Harn HJ. Exosomes in clinical trial and their production in compliance with good manufacturing practice. *Ci Ji Yi Xue Za Zhi.* 2019;32(2):113-120
- 149-Armiento AR, Alini M, Stoddart MJ. Articular fibrocartilage - Why does hyaline cartilage fail to repair?. *Adv Drug Deliv Rev.* 2019;146:289-305.
- 150-Boyiadzis, M., and Whiteside, T. L. (2015). Information transfer by exosomes: a new frontier in hematologic malignancies. *Blood Rev.* 29, 281–290. doi: 10.1016/j.blre.2015.01.004
- 151-Zhou, Q. F., Cai, Y. Z., and Lin, X. J. (2020). The dual character of exosomes in osteoarthritis: antagonists and therapeutic agents. *Acta Biomater.* 105, 15–25. doi: 10.1016/j.actbio.2020.01.040
- 152-Mendt M, Kamerkar S, Sugimoto H, McAndrews KM, Wu CC, Gagea M, et al. Generation and testing of clinical-grade exosomes for pancreatic cancer. *JCI Insight.* 2018;3 pii: 99263.
- 153-Zhu Y, Wang Y, Zhao B, Niu X, Hu B, Li Q, Zhang J, Ding J, Chen Y, Wang Y. Comparison of exosomes secreted by induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells and synovial membrane-derived mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis. *Stem Cell Res Ther.* 2017; 8(1):64
- 154-Keshtkar S, Azarpira N, Ghahremani MH. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther* 2018;9:63
- 155-Wu P, Zhang B, Shi H, Qian H, Xu W. MSC-exosome: a novel cell-free therapy for cutaneous regeneration. *Cytotherapy* 2018; 20:291–301.
- 156-Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *Int J Mol Sci.* 2017;18 pii: E1852
- 157-Gimona M, Pachler K, Laner-Plamberger S, Schallmoser K, Rohde E. Manufacturing of human extracellular vesicle-based therapeutics for clinical use. *Int J Mol Sci.* 2017;18 pii: E1190.

158- Amsar RM, Wijaya CH, Ana ID, et al. Extracellular vesicles: a promising cell-free therapy for cartilage repair. Future Sci OA. 2021

159- Shipin Zhang, Shang Jiunn Chuah, Ruenn Chai Lai, James Hoi Po Hui, Sai Kiang Lim, Wei Seong Toh, MSC exosomes mediate cartilage repair by enhancing proliferation, attenuating apoptosis and modulating immune reactivity, Biomaterials, Volume 156, 2018, Pages 16-27

160- Sağraç D, Aydın S, Sahin F. The Effect of Exosomes Isolated from Human Foreskin Stem Cells on Wound Healing 2019.

