



# Rejeneratif tıbbın tarihsel gelişimi ve terminolojisi

## Historical development of regenerative medicine and its terminology

A. Merter Özenci<sup>1</sup>, C. Çağrı Baysal<sup>2</sup>, Osman Civan<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Serbest Hekim, Antalya

<sup>2</sup>Demirci Devlet Hastanesi, Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği, Manisa

<sup>3</sup>Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Ana Bilim Dalı, Antalya

Rejeneratif (yenileyici) tıp, hasarlanmış dokunun kendi kendini onarabilme potansiyelinin çeşitli yollarla uyarılması ve/veya ilgili dokuya dönüşebilme potansiyeli olan kök hücrelerin hasarlı dokuya aktarılması yoluyla tedavi amaçlayan bilim dalıdır. Günümüzdeki teknolojik gelişime bağlı olarak osteoartrit, kırık defektleri, tendinopatiler, kas ve bağ yaralanmaları, gecikmiş kaynama, kaynamama, diyabetik ayak yarası ve avasküler nekroz gibi birçok ortopedik kas iskelet sistemi bozukluğunda replasman tedavisinin yerini yenileyici tedavi yöntemleri almaktadır. Rejeneratif tedavinin ortopedik anlamda ilk kullanım bölgesi kırık doku patolojileri olmuş, sonrasında diğer kas iskelet sistemi problemleri için uygulanmaya başlanmıştır. Birçok kas iskelet sistemi problemde kullanılan, hipertonic çözeltilerle doku harabiyeti yaratarak etki gösteren proloterapi, doku yenilenme faktörleri içeren trombosit zengin plazma (PRP) ve dokuyu yenileyebilme özelliği olan kök hücre tedavileri de öncelikle kırık doku patolojilerinde kullanılmıştır. Kas iskelet sistemi patolojileri için günümüze gelindiğinde dokuya özgü kombine edilmiş rejeneratif tedavi protokolleri araştırma konusu olmakta, onarılamayacak kadar büyük boyuttaki defektler için üç boyutlu doku mühendisliği yöntemleri geliştirilmektedir. Bu derlemede güncel literatür taraması yapılarak ortopedik rejeneratif tıp tedavi yöntemlerinin gelişim süreci ve bu tedavideki terminoloji gözden geçirilmiştir.

**Anahtar sözcükler:** ortopedik rejeneratif tıp tarihi; trombosit zengin plazma; kök hücre; osteoartrit; doku mühendisliği

Regenerative medicine is a science that aims to treat the damaged tissue by stimulating the self-healing potential of the damaged tissue in various ways and/or transferring the stem cells, which have the potential to transform into the related tissue, to the damaged tissue. Depending on today's technological developments, replacement (change/repair) treatment is replaced by regenerative treatment methods for many orthopedic musculoskeletal disorders such as osteoarthritis, cartilage defects, tendinopathies, muscle, and ligament tears, delayed union, nonunion, diabetic foot ulcer and avascular necrosis. After the use of regenerative therapy in cartilage disorders as the first time in orthopedics, it has started to be used for other musculoskeletal disorders. Prolotherapy, which acts with the hypertonic solutions by causing tissue destruction, platelet-rich plasma (PRP) containing tissue regeneration factors and stem cell therapies, which have the ability to regenerate tissue, that is used in many musculoskeletal problems, have also been used primarily in cartilage pathologies. Today, tissue-specific combined regenerative treatment protocols for musculoskeletal pathologies are the subject of research, and 3D tissue engineering methods are being developed for defects that are too large to be repaired. In this review, the development process of orthopedic regenerative medicine treatment methods and the terminology of this treatment were reviewed by searching the current literature.

**Key words:** history of orthopedic regenerative medicine; platelet-rich plasma; stem cells; osteoarthritis; tissue engineering

**K**as iskelet sistemi hastalıklarından sadece diz patolojileri, en yaygın görülen hastalıklardan birisi olarak fiziksel engellilikle sonuçlanan patolojiler içerisinde, en fazla pay sahibi olmuştur. Gelişmiş ülkelerde, osteoartritin tıbbi maliyeti gayri safi yurt içi hasılanın (GSYİH) %1-2,5'ini oluşturmaktadır.<sup>[1]</sup> Kas iskelet sistemi hastalıklarının tedavisi için konservatif

tedaviyle cerrahi tedavi arasında büyük bir boşluk bulunmaktadır. Rejeneratif tıptaki gelişmelere bağlı olarak insan vücudunda doğal olarak bulunan maddelerin ortopedi ve travmatoloji uzmanları tarafından kırık doku, kas, tendon, bağ yaralanmalarının iyileştirilmesi ve kırık kaynaması amaçlı kullanımı özellikle son on yılda artmıştır. Kas iskelet sistemi hastalıklarında bu

**İletişim / Contact:** Prof. Dr. A. Merter Özenci • E-posta / E-mail: merteroz@yahoo.com

**ORCID ID:** A. Merter Özenci, 0000-0002-1983-5652 • C. Çağrı Baysal, 0000-0002-4498-289X • Osman Civan, 0000-0003-0216-1169

**Geliş / Received:** 2 Nisan 2022 • **Revizyon / Revised:** 25 Haziran 2022 • **Kabul / Accepted:** 5 Ağustos 2022

tekniklerin kullanımıyla birlikte cerrahi tedaviye alternatif daha az invaziv bir tedavi imkânı sağlanmaktadır.<sup>[2]</sup>

Rejeneratif tıpla ilgili araştırma ve klinik uygulamalar yeni olmasına karşın bu tedavi şeklinin varlığı ve önemi eski çağlardan beri iyi bilinmektedir. Roma'da milattan önce dördüncü yüzyılda yaralı dokuya sıcak iğne tedavisi gibi zararlı uyarılar uygulayarak iyileşmeyi indüklemek bir tedavi şekli olarak kullanılmıştır.<sup>[3]</sup>

Birçok tıp branşında uygulama alanı bulan rejeneratif tıbbi tedavinin ortopedi ve travmatoloji alanındaki ana kullanım yeri haraplanmış veya dejenerasyona uğramış kıkırdak dokusunu yenileme amaçlı olmuştur.<sup>[4]</sup>

Osteoartrit ve eklem kıkırdağı yaralanmalarının rejeneratif tedavisinin son yüzyıldaki çeşitli dönüm noktaları bir zaman çizelgesi şeklinde Şekil 1'de gösterilmiştir. Osteoartrit tedavisi 1941'de gevşek dejenere kıkırdak, sinovyum ve osteofit parçacıklarının dizden çıkarılmasını ve geniş debridmanla iyileşme yanıtının indüklenmesini tanımlayan Magnuson'a kadar konservatif şekilde yapılmıştır.<sup>[5]</sup> Geniş debridman prosedürü, formal artroplastikle değiştirilene kadar uzun yıllar kullanılmıştır. Debridman tedavisinden sonra ilerleyen tarihsel süreçte proloterapi tedavisi ortaya çıkmıştır.

## PROLOTERAPİ

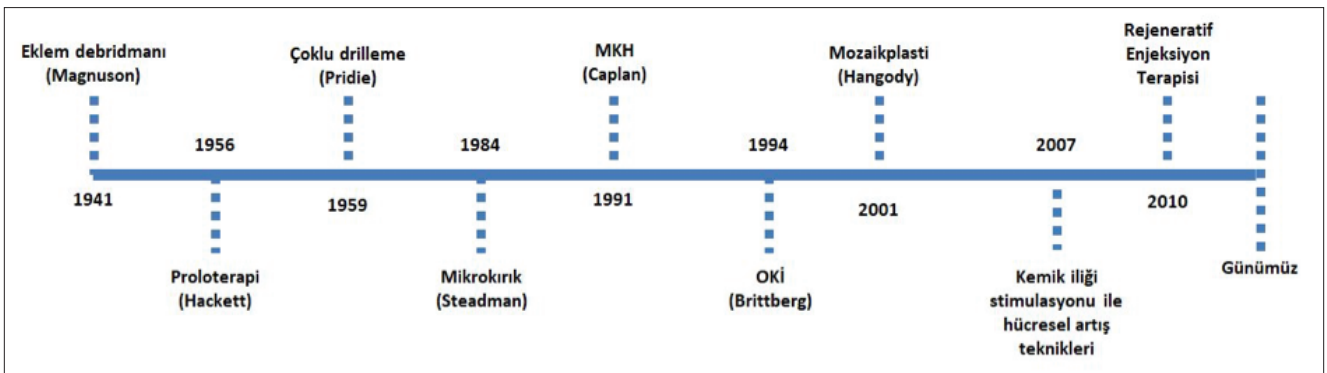
Proloterapi, kronik olarak haraplanmış eklem dışı ve eklem içi dokuların içerisine hipertonic çözeltilerin enjekte edilerek enflamatuvar ve enflamatuvar olmayan yolakların uyarılması yoluyla lokal doku iyileşmesi/yenilenmesi işlemidir. Amerika Birleşik Devletleri'nde bir genel cerrah olan Dr. George Hackett, proloterapi için enjeksiyon protokollerini rejeneratif tıp tekniği olarak ilk defa 1956'da tanımlamıştır.<sup>[6]</sup> Yüksek güvenlik profiline sahip ve nispeten ucuz bir tedavi yöntemi olması nedeniyle proloterapi, birinci basamakta kolayca uygulanabilen bir tedavi olarak değerlendirilmelidir.<sup>[6]</sup>

Proloterapinin, enjekte edildiği bölgede hiperozmolar ortam yaratmasına bağlı olarak etki gösterdiği öne sürülmüştür ve oluşan hiperozmolar ortamın pro-enflamatuvar yanıtı indüklediği, büyüme faktörlerinin salınımına sebep olarak rejeneratif süreci (vasküler, fibroblast ve kıkırdak proliferasyonu) ve kollajen oluşumunu arttırdığı düşünülmektedir.<sup>[7]</sup> Ayrıca, hiperozmolar dekstroz çözeltisi enjeksiyonunun potasyum kanallarını açık tutmaya zorlayarak nosiseptif ağrı liflerini hiperpolarize edebildiği ve bunun da ağrı algısının azalmasına neden olduğu gösterilmiştir.<sup>[7]</sup>

Diz osteoartrit tedavisinde hipertrofik dekstroz proloterapinin egzersiz ve salin gibi dekstroz dışı proloterapi enjeksiyonlarına göre daha olumlu sonuçlar doğurduğu, ayrıca eklem içi ve eklem çevresine uygulanabileceği gösterilmiştir.<sup>[8]</sup> Dekstrozun periartiküler uygulama yönteminde iki farklı teknik mevcuttur. Lyftogt'un tekniğinde deri altı dokulara, Hackett'in tekniğindeyse bağların veya tendonların fibroosseöz birleşimine dekstroz enjeksiyonu yapılmaktadır.<sup>[7,9,10]</sup>

## MİKROKIRIK

Pridie, 1959'da osteoartrit tedavisi için Magnuson'un debridman tekniğini modifiye ederek eklem kıkırdak defektlerinde rejeneratif bir yanıtı ortaya çıkarmak amacıyla yakın aralıklı çoklu delme tekniğini ortaya koymuştur ancak hastaların uzun süreli klinik sonuçlarını gösterememiştir.<sup>[11]</sup> 1980'lerin başlarında çoklu delme tekniğindeki ısı nekrozunun olumsuz etkisi oluşmaması için deliklerin biz (awl) gibi yardımcı malzemeler kullanılarak oluşturulduğu mikrokirik (MK) yöntemi tariflenmiştir.<sup>[12]</sup> Kullanılan her iki teknikteki amaç da kemik iliğindeki kök hücrelerin hasarlı kıkırdak bölgesine getirilip, eklem ortamında kıkırdak benzeri bir tamir dokusuna dönüşmesini sağlamaktır.<sup>[13]</sup> Mikrokirik yöntemiyle küçük defektlerde ( $\leq 1,5 \text{ cm}^2$ ) büyüklere göre ve 40 yaş altı genç hastalarda yaşlı hastalara göre daha iyi rejenerasyon sağlandığı gösterilmiştir.<sup>[14]</sup>



Şekil 1. Eklem patolojileri için kullanılmış rejeneratif tedavi protokollerinin son yüzyıldaki gelişimi. (MKH: Mezenkimal kök hücre, OKİ: Otolog kondrosit implantasyonu).

## OTOLOG KONDROSİT İMPLANTASYONU

Otolog kondrosit implantasyonu (OKİ) Brittberg ve ark. tarafından kondral defektlerin giderilmesi için 1994'te geliştirilen bir tekniktir.<sup>[15]</sup> Bu teknik, otolog eklem yüzeyinin ağırlık taşımayan alanından kondrositlerin toplanarak *in vitro* kültürle çoğaltılmasını ve kıkırdak defektlerine implantasyonunu içermektedir. Bu tekniğin tanımlanmış üç nesli vardır. İlk nesilde OKİ hücreleri bir periosteal yamanın altına enjekte edilerek kullanılmıştır fakat periosteal yamanın yerinden çıkması veya hiperplazisi komplikasyonları nedeniyle zaman içinde bu yöntemden vazgeçilmiştir.<sup>[16]</sup> İkinci nesil OKİ'de periost yerine kollajen I/III membran kaplama kullanılmıştır.<sup>[17]</sup> Üçüncü nesil OKİ tekniği esasen jel bazlıdır. Fokal kıkırdak lezyonları için kültürle genişletilmiş kemik iliği kökenli kök hücrelerin veya OKİ hücrelerinin doku iskelesi içine ekilmesine dayanmaktadır. Bu neslin diğer ismi matriks kaynaklı otolog kondrosit implantasyonu (MOKİ) olmakla birlikte doku mühendisliği kategorisine dâhil olmaktadır.<sup>[18]</sup>

## MOZAIKPLASTİ / OSTEOKONDRAL TRANSPLANTASYON

Hangody ve Füle tarafından keşfedilerek popüler hâle getirilen daha yeni bir tekniktir.<sup>[19]</sup> Osteokondral kolonların, hastanın femoral troklear gibi ağırlık taşımayan eklem yüzeylerinden eklem kıkırdak kusuru bulunan bölgelere transplantasyonunu ifade eder.

Osteokondral transplantasyon (OKT) uygulanmasının basit olması, hızlı iyileşmesi ve bağışıklık reddinin olmaması gibi avantajları vardır.<sup>[20]</sup> Bir kusuru hemen hyalin kıkırdakla doldurabilir; yüzeyi bağımsız osteokondral kolonlardan oluşur, ancak bunlar bir bütün olarak gerçekten birbirine bağlı değildir. Osteokondral transplantasyonun küçük defekt boyutu veya eksfoliyatif osteokondriti olan hastalar için uygun olduğu bildirilmiştir.<sup>[20]</sup>

Yıllar içinde, tıbbi gelişmeler ve minimal invaziv prosedürlerle en büyük avantajları bulma arayışı, rejeneratif enjeksiyon tedavisi (RET) çağını doğurmuştur. Linetsky, biyolojik yenilenmeyi sağlayan materyallerin patolojik bölgeye enjeksiyonu anlamına gelen RET terimini ortaya atmıştır. Literatürde RET için sodyum bikarbonat/kalsiyum glukonat, hyalüronik asit (HA), dekstroz, kök hücre, trombosit zengin plazma (*Platelet Rich Plasma-PRP*) kemik morfojenik protein (*Bone Morphogenic Protein, BMP*) 2/7 gibi çeşitli ajanlar kullanılmıştır.<sup>[21]</sup> Enflamasyon ve araçları hakkında daha fazla araştırma yapıldıkça PRP enjeksiyonları doku yenilemek için bir yöntem olmaya başlamıştır.<sup>[22]</sup>

## TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA

Trombosit zengin plazma kavramı orijinal olarak transfüzyon tıbbında geliştirilmiştir. Trombosit zengin

plazma terimi bu alanda ilk defa 1954'te Kingsley tarafından şiddetli trombositopenisi olan hastaları tedavi etmek için kullanılan trombosit konsantrasyonunu tanımlamak için kullanılmıştır.<sup>[23]</sup>

Doku iyileşmesini arttırmak için kandan türetilen ürünleri kullanma fikri ilk defa 1970 yılında Matras'ın bir sıçan modelinde fibrin yapıştırıcı kullanımı üzerine yaptığı çalışmalarla başlamıştır.<sup>[24]</sup> Cerrahi alanda ilk kez 1987 senesinde açık kalp ameliyatı sırasında kalp cerrahları tarafından kullanılmıştır.<sup>[25]</sup> 2000'li yılların başlarında maksillofasial cerrahide ve devam eden süreçte çeşitli kas iskelet sistemi hastalıklarında kullanılmaya başlanmıştır.<sup>[26]</sup>

Trombosit türevleri, özelliklerine ve hazırlama yöntemlerine göre iki farklı kuşakta sınıflandırılabilir.

### Birinci Kuşak Trombosit Konsantrasyonları

Birinci kuşak trombosit konsantrasyonlarından ilki olan klasik otolog manuel PRP'nin üretim protokolünde; iki adımlı bir santrifüj prosedürü kullanılmıştır. İlk adımda antikoagülanlarla ve düşük devir santrifüj sonrası '*buffy coat*' (BC) ve trombosit açısından zayıf plazma (PPP) toplanmaktadır. İkinci basamak işlemdeyse toplanan sıvıya yüksek devirde (*hardspin*) ve uzun süreli santrifüjden sonra PRP elde edilmektedir.<sup>[27]</sup>

Birinci kuşak trombosit konsantrasyonlarından diğeri olan büyüme faktörlerinden zengin plazma (*Plasma Rich in Growth Factors, PRGF*) 1999 yılında Anitua tarafından tanımlanmıştır.<sup>[28]</sup> Bu protokolde, venöz kan toplanarak üç tabakayı (eritrositler, *buffy coat* ve hücresiz plazma) elde etmek için santrifüj edilmektedir. Hücresiz plazmanın üst kısmı olan büyüme faktörlerinden zayıf plazma (*Plasma/Platelet Poor in Growth Factors, PPGF*) pipet yardımıyla tüpten ayrılarak geriye kalan plazma PRGF olarak adlandırılır ve pipetle toplanmaktadır.<sup>[27]</sup>

Trombosit zengin plazma ve PRGF'nin hazırlanmasında pıhtılaşma faktörlerine ayrıca fibrin polimerizasyon induksiyonu için sığır trombin veya CaCl<sub>2</sub>'e ihtiyaç duyulmaktadır.<sup>[27]</sup> Bu faktörlere ek olarak; trombosit konsantrasyonunu arttırmak için iki ayrı aşamada santrifüj edilmesi gibi faktörler bu konsantrasyonların kullanımını sınırlamaktadır. Trombosit zengin plazmanın sıvı formu sebebiyle diğer biyomateryallerle kombine edilerek kullanılması gerekliliği ve yapısındaki depo hâldeki büyüme faktörlerinin büyük bir kısmının bir saat gibi kısa sürede salınımına bağlı olarak klinik etkinliği azalmaktadır.<sup>[29]</sup>

### İkinci Kuşak Trombosit Konsantrasyonları

Trombosit zengin plazma ve PRGF hazırlanma aşamalarındaki zorluklarından dolayı, 2001 yılında

Choukroun ve ark. tarafından ikinci kuşak trombosit konsantrasyonu olan trombosit zengin fibrin (*Platelet Rich Fibrin*, PRF) tanımlanmıştır.<sup>[30]</sup> Trombositten zengin fibrinin elde edilmesi için herhangi bir ilave madde gerekmemekle birlikte venöz kanın santrifüjüyle basit bir şekilde elde edilebilmektedir. Antikoagülanlar kullanılmadan tam kanın yüksek devirde (2700-3000 rpm'de 10-12 dk) santrifüj edilmesiyle oluşan üç tabaka arasından ayrıştırılmayla PRF elde edilmektedir.<sup>[27]</sup>

Büyüme faktörlerinin salınımı PRP'de birinci gün maksimum değere çıkmasına ve yedi gün boyunca sürmesine karşın PRF'de yedi gün içinde zirve değere çıkmakta ve 21 günlük süre boyunca devam etmektedir. Bunun sonucunda PRF'nin rejeneratif etkinliği PRP'ye göre daha uzun sürmektedir.<sup>[31]</sup>

2009 yılında Ehrenfest ve ark. tarafından trombosit konsantreleri, lökosit ve fibrin içeriğine göre lökositler olmaksızın PRGF'yi içeren sap PRP (P-PRP), lökositlerle birlikte PRP (L-PRP), P-PRF ve L-PRF olmak üzere dört kategoriye ayrılmıştır.<sup>[32]</sup>

Bu trombosit konsantrasyonları, elde edilme yöntemlerindeki farklılıklara göre kategorize edilmelerine karşın; asıl olarak yapılarındaki lökosit içeriğine ve fibrin yoğunluğuna göre ayrılmaktadır. Fibrin yapısı P-PRP ve L-PRP preparatlarında küçük çaplı basit fiber polimerizasyonunda olduğu için olgunlaşmamıştır. Diğer taraftan, P-PRF ve L-PRF preparatlarındaysa fibrin lifleri, çoklu lif birleşimi nedeniyle kalın ve bir fibrin biyomateryali olarak düşünüldüğünde dirençli bir matriks oluşturmaktadır. Fibrin trombosit ve lökositlerin üzerine tutunduğu bir ağ görevi görmektedir.<sup>[33]</sup>

Kıyaslandığında PRP ve PRF'nin içerdiği büyüme faktörü miktarı benzer olmasına rağmen, PRF'de görülen daha uzun süreli rejenerasyon etkisi, PRF'deki fibrin yoğunluğuna bağlı olarak üzerindeki büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin daha yavaş salınımıyla açıklanmaktadır.<sup>[31]</sup>

2014 yılında, PRF'nin geliştiricisi olan Choukroun tarafından, düşük hızlı santrifüjle oluşan ve daha fazla sayıda nötrofille trombosit içeren gelişmiş bir PRF formu olan A-PRF tanımlanmıştır.<sup>[34]</sup> Nötrofil içeriği açısından zengin olması anjiyogenezi artırma açısından pozitif fayda sağlamaktadır.<sup>[35]</sup>

2015 yılında Mauroa ve ark., 9 ml venöz kanı anti-koagülan içermeyen tüplerde dakikada 3300 devirde iki dakika yatay santrifüje (B-40, RDE®, Brezilya) ederek beyaz kan hücrelerini, trombositleri, kök hücreleri ve endotel hücrelerini içeren bir trombosit konsantrasyonu olan 'enjekte edilebilir trombosit zengin fibrin' (i-PRF) elde etmişlerdir.<sup>[36]</sup>

İkinci nesil trombosit konsantrasyonlarından bir diğeri olan konsantre büyüme faktörü (*concentrated growth factor*, CGF), ilk olarak 2006 yılında Sacco tarafından kan numunelerinin, özel bir santrifüj cihazında (Medifuge, Silfradent, İtalya) dönüşümlü ve kontrollü hızlarda (2700 rpm-iki dakika, 2400 rpm-dört dakika, 2700 rpm-dört dakika, 3000 rpm-üç dakika) santrifüj edilmesiyle elde edilmiştir.<sup>[37]</sup> Trombositten zengin fibrine kıyasla CGF'nin ana özelliği daha zengin büyüme faktörleri içermesi ve daha yoğun fibrin matriksinin bulunmasıdır. Konsantre büyüme faktörü içeriği sayesinde PRF'ye kıyasla daha uzun süreli büyüme faktörü salınımı yaparak rejeneratif sürece daha uzun etki edebilmektedir.<sup>[38]</sup>

## KÖK HÜCRELER

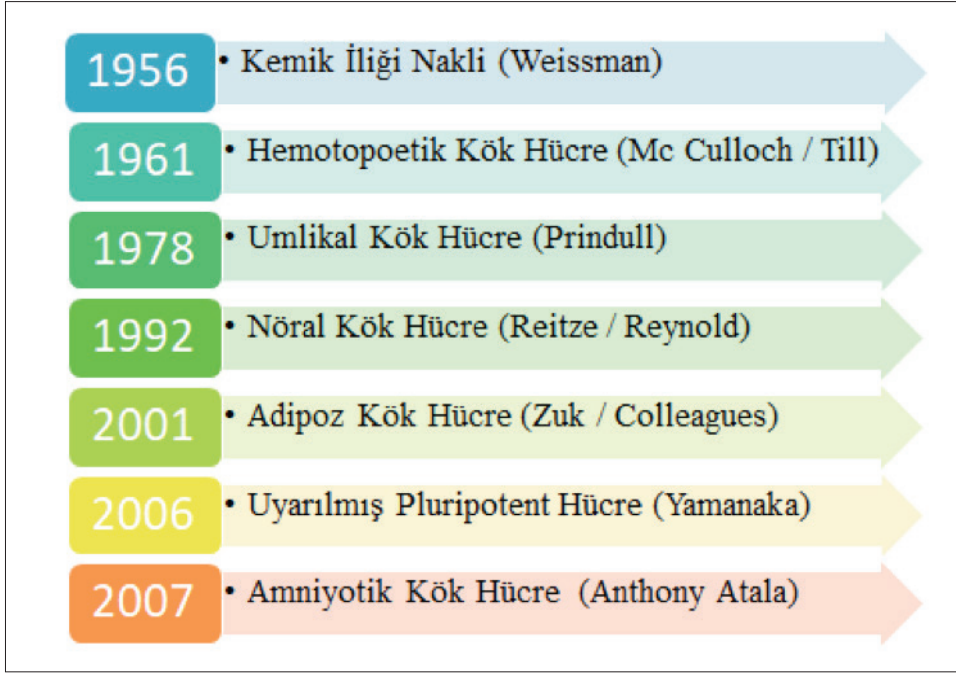
Özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşma, klonlaşma ve kendi kendini yenileyebilme yeteneğine sahip hücrelere kök hücre denir. Kök hücreler embriyonik olan, embriyonik olmayan (fetal ve erişkin kök hücreler) ve indüklenmiş multipotent kök hücreler olmak üzere üç ana gruba ayrılmaktadır.<sup>[39]</sup>

Kök hücre tedavisinin tıbbi olarak ilk kez kullanımı, 1956'da lösemili bir hasta üzerinde ilk kemik iliği naklini gerçekleştiren Weissman'a atfedilebilir.<sup>[40]</sup> O zamandan beri, çeşitli bilim adamları farklı kök hücre türlerini tanımlamış ve bu hücreleri rejeneratif tedavide kullanmıştır (Şekil 2).

## Ortopedi ve Travmatoloji Alanında Kök Hücre Tedavisinde Kullanılan Hücre Kaynakları

Erişkin kök hücre alt tipi olan mezenkimal kök hücreler (kemik iliği, yağ dokusu, sinovyum veya göbek kordonu kaynaklı) ve fetal kök hücreler (amniyon sıvısı ve membran kaynaklı) ortopedi ve travmatoloji kliniklerinde en yaygın kullanılan kök hücre tipleridir. Kök hücre, kaynak olarak allojenik (başka bir kişiden) veya otolog (kişinin kendisinden) olarak elde edilir. Allojenik kök hücreler en yaygın olarak amniyotik kordon kanından elde edilmekle birlikte bunu amniyotik ve embriyonik dokular takip eder. Otolog kök hücreler en yaygın olarak kemik iliği aspirasyonundan veya yağdan türetilir. Kemik iliğinden veya yağdan elde edilen doku, mekanik (santrifüj) ve/veya enzimatik etkenler kullanılarak kök hücre yüzdesinin arttığı solüsyona devşirilir.<sup>[40]</sup> Eğer bu hücre solüsyonunu elde etmek için enzim kullanıldıysa minimal manipülasyondan söz edilir. Enzim kullanmadan yapılan hücre süspansiyonu daha ucuz ve daha kısa sürede elde edilmektedir. İster santrifüj olsun ister enzimatik yolla elde edilen hücre solüsyonu olsun aynı seansta veya 24 saat içinde hasarlı bölgeye uygulanmalıdır.





Şekil 2. Kök hücre türlerinin tanımlanma tarihleri.

Otolog kök hücreler *in vitro* ortamda kültüre edilerek de kullanılabilir. Bu yöntem daha çok fokal lezyonlar için kullanılmakla birlikte, işlem için ikinci bir girişime gerek duyulmaktadır. Birkaç hafta boyunca hücre konsantrasyonunu arttırmak için *in vitro* olarak çıkarılan ve kültürlenmiş hücrelerde genetik bozukluklar oluştuğu, yaşlanmanın arttığı ve farklılaşma yeteneğinin azaldığının gözlenmesi kültürlenme yönteminin dezavantajları olarak ortaya konulmuştur.<sup>[41]</sup>

### Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler (MKH'ler), mezojenik süreç yoluyla kemik, kıkırdak, yağ ve diğer dokuları oluşturmak için *in vitro* kapasiteye sahip bir hücre sınıfını temsil etmek için 90'lı yıllarda kullanılan bir terimdir. 2006 yılında, Uluslararası Hücre Tedavi Derneği, hücrelerin MKH olarak kabul edilebilmesi için:

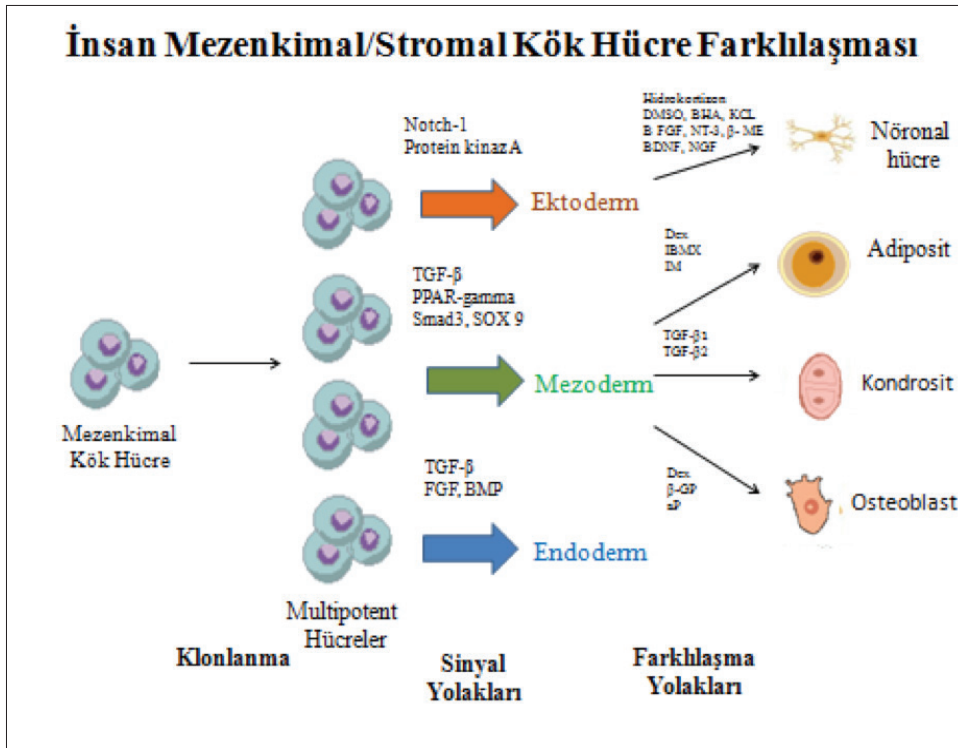
1) *In vitro* ortamda kültür koşullarında plastiğe yapışma,

2) CD 73, 90 ve 105 gibi hücre yüzey antijenlerini hücre yüzeyinde yüksek oranda bulundurmasına karşın CD 34, 45, 14, 11b, 19'u ve HLA-DR antijenlerini içermeme veya düşük oranda içermeme,

3) *In vitro* olarak osteoblastlara, kondroblastlara ve adipositlere farklılaşabilme özelliklerinin bulunması gerektiğini bildirmiştir (Şekil 3).<sup>[42]</sup>

### Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları ve İzolasyonu

Varsayım olarak insan vücudundaki hemen hemen tüm dokulardan MKH elde edilebileceği düşünülse de kullanılan ana kaynaklar kemik iliği ve yağ dokusudur. Kemik iliği kaynaklı MKH'ler fonksiyonel olarak klinik tedavilerde kullanılan hücrelerin çoğunluğunu oluşturan ve en çok araştırılan kök hücrelerdir. Kemik iliği konsantrasyonunu (KİK) elde edebilmenin en güvenilir yolu; en yüksek MKH konsantrasyonuna sahip olan iliak kristadan ultrason ya da floroskopi altında kemik iliği aspirasyonudur. Kemik iliği hücrelerinin çeşitli işlevleri yerine getirmek için çok sayıda büyüme faktörü (*growth factor*, GF), sitokin ve kemokin salgıladıkları bilinmektedir.<sup>[43]</sup> Özellikle KİK içinde eritroblastlar, nötrofiller, eozinofiller, bazofiller, monoid hücreler (mezenkimal kök hücre ve makrofaj içeren monositler), lenfositler ve plazma hücreleri bulunmaktadır. Küçük hacimlerde iliak kristanın birçok bölgesinden aspirasyon yapma sonucu yüksek miktarda çekirdekli hücre sayısı elde etmek mümkündür. Yaş artışıyla birlikte kemik iliğindeki MKH sayısı azalmaktadır. Yenidoğanda 10,000 çekirdekli hücre içerisinde bir kök hücre bulunabilirken yaş ilerledikçe bu oran iki milyonda bire kadar düşebilmektedir.<sup>[44]</sup> Yağ dokusu karın, kol, peri gluteal bölge ve uyluk gibi bölgelerde bulunan visseral veya subkutan yağ dokusunun aspirasyonu (*liposuction*) veya eksizyonu yoluyla MKH'lerin toplandığı başka bir kaynaktır. Yağ dokusu esas olarak adipositlerden oluşsa da aynı zamanda adipoz doku kaynaklı kök hücre



(AMKH)'lerini, endotel hücrelerini, perisitleri, fibroblastları ve hemopoetik soy hücrelerini kapsayan stromal vasküler fraksiyonu da (SVF) içermektedir. Adipojenik öncüller insan yağ dokusundan 1976 yılında izole edilmiş olmakla birlikte, 2001'de AMKH'ler insan lipo-aspiratında tanımlanmış ve karakterize edilmiştir.<sup>[45]</sup>

Yağ dokusu genellikle diğer kaynakların içeriğinden çok daha fazla MKH içerir. Öyle ki MKH'ler, yağ dokusundaki tüm hücrelerin %3 kadarını oluşturabilirken, kemik iliğinde ancak %0,01 oranında bulunmaktadır.<sup>[46]</sup> Bu da AMKH'leri klinik uygulamalar için daha elverişli hâle getirmektedir.<sup>[46]</sup>

Eklem içi sinovya dokusundan da MKH elde etmek mümkündür. Yüksek oranda kondrojenik farklılaşma potansiyeline sahip olduğu gösterilen, sinovyal dokudan elde edilen MKH konsantrasyonunun oransal ve hacimsel olarak az olması nedeniyle iyileştirme kapasitesi ve klinik kullanımı sınırlı kalmaktadır.<sup>[47]</sup> Son yıllarda yayımlanan bazı çalışmalarda insan kıkırdığının da kök hücre içerdiği ve insan kıkırdığından kök hücre elde edilebileceği bildirilmiştir.<sup>[48,49]</sup>

Mezenkimal kök hücreler, istenilen dokuya farklılaştırmak ve büyük hacimde doku elde etmek için kültüre edilerek veya enjeksiyon şeklinde kültüre edilmeden kullanılabilir. Adipoz veya kemik iliği kaynaklı

MKH'leri izole etmek için birçok yöntem tanımlanmış olmakla birlikte bu yöntemler enzim kullanılıp kullanılmamasına göre ikiye ayrılmaktadır.<sup>[50]</sup>

### Allojenik (Amniyotik Sıvı ve Membran Kaynaklı) Ürünler

Ortopedik patolojilerde kullanılmak üzere izole edilebilen bir diğer kök hücre kaynağı da amniyotik sıvı ve membran kaynaklı hücrelerdir. Amniyotik sıvı (AS), fetüsü çevreleyen bariyer görevi gören sıvı olmakla birlikte, içeriğinde embriyon dışı yapılardan ve fetal dokulardan köken alan hücreler bulunmaktadır. Amniyon sıvısında bulunan kök hücreler Amniyon sıvısı kaynaklı mezenkimal kök hücreler (ASKH) ve amniyon sıvısı kök hücresi (ASKH) olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar.<sup>[51]</sup>

Amniyon sıvısı kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin yağ ve KİK'ten elde edilen MKH'lere göre *in vitro* ortamda çok daha hızlı çoğalabildiği gösterilmiştir. Kültüre edilen ASKH'ler de çok hızlı şekilde çoğalmakla birlikte; kültüre edilen MKH'lere göre nispeten daha uzun süre (soy boyunca) genetik stabilitesini ve farklılaşma özelliğini koruyarak çoğaltılabildiği gösterilmiştir.<sup>[52]</sup>

Kök hücre kaynağı olan amniyotik sıvı ve membran, doğum sonrası veya ikinci trimesterde amniyosentezle elde edilebilmektedir. Alınan amniyotik sıvı veya memb-

ran ürünü kök hücreleri dokudan izole etmek için çeşitli enzimler (dispaz 2, kollajenaz 2 gibi) kullanılır. Bir sonraki aşamada çözelti süzülerek kültüre edilir. Eğer kültüre kök hücrelerin osteojenik veya kondrojenik farklılaşması isteniyorsa gerekli indükleyici faktörler (*Transforming Growth Factor- $\beta$* , TGF- $\beta$  ve *Bone Morphogenic Protein*, BMP gibi) kültüre eklenebilir. Çeşitli yollarla çoğaltılan ve farklılaşan hücre popülasyonu otojenik olarak kullanılabilir.<sup>[53]</sup>

Amniyotik membran ve sıvı kaynaklı kök hücreler dondurularak saklama yoluyla allojenik olarak da kullanılabilir. Allojenik kullanımın avantajı rafta stabil olarak kök hücre deposu oluşturulabilmesidir. Dondurulmuş olarak kullanılan amniyon sıvısı allogreftlerindeki kök hücrelerin kullanım öncesi aşamada ani ısıtma nedeniyle canlılıklarını kaybettikleriyle ilgili ciddi şüpheler mevcuttur.

Amniyon sıvısı, büyüme faktörlerini (EGF, IGG 1-2, FGF, TGF- $\beta$ , VEGF), anti-enflamatuvar (TIMP), enflamatuvar faktörleri (IL-8) ve ekstrasellüler makromolekülleri (kondroitin sülfat, hyalüronik asit) yapısında barındırmaktadır. Uzun vadeli allojenik kullanımda kök hücreler canlılığını kaybetse dahi içeriğinde bulunan bu faktörler nedeniyle PRP'ye benzer şekilde doku rejenerasyonunu indükleyebileceği umut edilmektedir.<sup>[54]</sup>

Kök hücre tedavileri PRP tedavisi uygulayabileceğimiz tüm kas iskelet sistemi hastalıklarında uygulanabilir. Bu iki tedavi arasındaki farkı açıklamanın en iyi yolu şantiye benzetmesidir. Kök hücreler, onarım işini koordine eden genel yüklenici olarak bilinmekte ve gerektiğinde “tuğla ve harç” hücrelere de dönüşebilmektedirler. Trombositten zengin plazma ise işi yapmak için gerekli malzemeleri sağlamaktadır.

## ORGANOİDLER (DOKU MÜHENDİSLİĞİ)

Organoid, laboratuvar ortamında (*in vitro*), kök hücrelerin çeşitli dönüşüm faktörleriyle muamelesi sonucu geliştirilmiş, küçültülmüş ve basitleştirilmiş organlara verilen isimdir. Literatüre 2000'li yıllarda girmiş yeni bir kelimedir. Fokal kayba uğrayarak hasar görmüş kas iskelet sistemi dokularının yerine organoidlerin yerleştirilmesi çözüm sağlama yolu olabilir.

Organoid oluşturulmasında kök hücre, doku iskelesi ve dönüştürücü faktörler olmak üzere üç temel bileşen vardır. Ototolog kök hücreler, avantajları ve sınırlamaları bulunan birçok doku türünden temin edilebilmektedir.<sup>[55]</sup> Osteokondral hasarlar için yapılan doku mühendisliğinde kök hücrelerin kullanımı yaygın değilken, dokuya özgü ototolog hücreler (osteoblast/kondroblast) kullanılmıştır. Kondrositlerin vücutta sınırlı sayıda bulunması (toplam kıkırdak hacmin %5'inden az), kollajenazla izolasyon

aşamasında hücrelerin zarar görmesi, alınan hücrelerin çoğaltılma aşamasında fenotiplerini kolay kaybetmeleri ve tedavi sonucunda hyalin kıkırdak yerine fibrin kıkırdak oluşması gibi nedenlerle günümüzdeki doku mühendisliği çalışmalarında dokuya özgü hücreler yerine kök hücreler tercih edilmesine sebep olmuştur.<sup>[56]</sup> Temin edilen kök hücrelerinden üç boyutlu organoid oluşturulabilmesi için hücre iskelelerine ihtiyaç duyulmaktadır. Kök hücreler, daha ucuz ve kullanımı daha kolay olan klasik kültür kabında da çoğaltılabilir, ancak kültür kabında üç boyutlu doku elde etme şansı yoktur. Organoid araştırmalarında en büyük sıçramayı hücrelerin üç boyutlu bir şekilde büyümelerini sağlamak için iskele rolü gören materyallerin geliştirilmesi sağlamıştır.

Bu amaçla üretilmiş, organik veya sentetik birçok materyal vardır. Organik polimerler içerisinde tip I/III kollajen, hyalüronik asit, jelatin, laminin, aljinat-agaroz hidrojel gibi materyaller bulunmaktadır. Bu maddeler jelleşerek üç boyutlu yapı oluşturur ve hücre tutunması ve çoğalması için ana yapıyı oluşturur.<sup>[57]</sup> Bu biyomalzemeler, yüksek biyouyumluluk ve bozunma ürünlerinin toksik olmaması gibi avantajlara sahiptir. Başlangıçta iskele, tohum hücreleri için bir yüzey, üç boyutlu alan ve destek sağlar. Yeni doku üretildiğinde, yapı iskelesi kademeli olarak bozulur. Diğer yandan hidroksiapatit, bi/trikalsiyum fosfat gibi inorganik malzemeler veya poli-kaprolakton ve poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) gibi sentetik polimerler de özellikle kemik-kıkırdak yapıları için doku iskelesi olarak kullanılabilir.<sup>[58]</sup>

Bir kültür kabının içine uygun kültür sıvısı konulduktan ve bu sıvı içinde üç boyutlu iskele oluşturularak ortama kök hücreler konulduktan sonra yapılması gereken son işlem dönüştürücü faktörlerin eklenmesidir. Bu faktörler, içinde çeşitli proteinlerin, hormonların ve besinlerin bulunduğu bir karışım olup her biri hedeflenen organoide özel protokollerle kullanılmaktadır. Dönüştürücü faktörlerin kültür ortamına doğru miktarlarda ve doğru zamanlarda uygulanması hedeflenen organoide ulaşmak için çok önemlidir. Bu uyarıcı/dönüştürücü faktörler arasında BMP 2, BMP 7, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, IGF-1, FGF gibi büyüme faktörleri yer almaktadır. Trombositten zengin plazma da bu amaçla kullanılabilir.<sup>[59,60]</sup>

2022 yılı itibarıyla literatüre baktığımızda henüz insana tam bir organoid nakli yapılmamıştır. Bu konuda henüz hem teknoloji yetersizdir hem de yasal ve etik engeller söz konusudur. Günümüzde organoidden ziyade kök hücre nakilleri söz konusudur. Gelişen teknolojiye bağlı olarak ilerleyen yıllarda belki de büyük derecede kas iskelet sistemi defektleri dahi defekt boyutlarına uygun şekilde üretilen organoidlerle tedavi edilebilir hâle gelecektir.

## KAYNAKLAR

1. Hiligsmann M, Cooper C, Arden N, Boers M, Branco JC, Luisa Brandi M, et al. "Health economics in the field of osteoarthritis: An expert's consensus paper from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO). *Semin Arthritis Rheum* 2013;43(3):303-13. [Crossref](#)
2. Moatshe G, Morris ER, Cinque ME, Pascual-Garrido C, Chahla J, Engebretsen L, et al. Biological treatment of the knee with platelet-rich plasma or bone marrow aspirate concentrates. *Acta Orthop* 2017;88:670-4. [Crossref](#)
3. Kumar AV, Jaishankar HP, Kavitha AP, Naik PR. Prolotherapy: A new hope for temporomandibular joint pain. *Indian J Pain* 2013;27:49-52. [Crossref](#)
4. Anz AW, Bapat A, Murrell WD. Concepts in regenerative medicine: Past, present, and future in articular cartilage treatment. *J Clin Orthop Trauma* 2016;7(3):137-44. [Crossref](#)
5. Magnuson PB. Joint debridement: Surgical treatment of degenerative arthritis. *Surg Gynaecol Obstet* 1941;73:1-9.
6. Reeves KD, Sit RW, Rabago DP. Dextrose Prolotherapy: A Narrative review of basic science, clinical research, and best treatment recommendations. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 2016;27(4):783-823. [Crossref](#)
7. Hassan F, Trebinjac S, Murrell WD, Maffulli N. The effectiveness of prolotherapy in treating knee osteoarthritis in adults: A systematic review. *Br Med Bull* 2017;1;122(1):91-108. [Crossref](#)
8. Sit RW, Chung VC, Reeves KD, Rabago D, Chan KK, Chan DC, et al. Erratum: Hypertonic dextrose injections (prolotherapy) in the treatment of symptomatic knee osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2017;7:45879. [Crossref](#)
9. Lyftogt J. Subcutaneous prolotherapy treatment of refractory knee, shoulder and lateral elbow pain. *Aust Musculoskeletal Med* 2007;12:110-2.
10. Hackett GS. Joint stabilization through induced ligament sclerosis. *Ohio State Med J* 1953;49:877-84.
11. Pridie KH. A method of resurfacing osteoarthritis knee joints. *J Bone Joint Surg Br* 1959;41:618-9.
12. Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK. Microfracture: Its history and experience of the developing surgeon. *Cartilage* 2010;1(2):78-86. [Crossref](#)
13. Steadman JR, Briggs KK, Rodrigo JJ, Kocher MS, Gill TJ, Rodkey WG. Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: Average 11-year follow-up. *Arthroscopy* 2003;19(5):477-84. [Crossref](#)
14. Salzmann GM, Sah B, Südkamp NP, Niemeyer P. Clinical outcome following the first-line, single lesion microfracture at the knee joint. *Arch Orthop Trauma Surg* 2013;133(3):303-10. [Crossref](#)
15. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994;331:889-95. [Crossref](#)
16. Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, Akerlund EL, Lindahl A. Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability. *Am J Sports Med* 2002;30(1):2-12. [Crossref](#)
17. Steinwachs M, Kreuz PC. Autologous chondrocyte implantation in chondral defects of the knee with a type I/III collagen membrane: A prospective study with a 3-year follow-up. *Arthroscopy* 2007;23(4):381-7. [Crossref](#)
18. Wakitani S, Goto T, Young RG, Mansour JM, Goldberg VM, Caplan AI. Repair of large full-thickness articular cartilage defects with allograft articular chondrocytes embedded in a collagen gel. *Tissue Eng* 1998;4(4):429-44. [Crossref](#)
19. Hangody L, Füles P. Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A(Suppl 2):25-32. [Crossref](#)
20. Hangody L, Dobos J, Baló E, Pánics G, Hangody LR, Berkes I. Clinical experiences with autologous osteochondral mosaicplasty in an athletic population: A 17-year prospective multicenter study. *Am J Sports Med* 2010;38(6):1125-33. [Crossref](#)
21. Linetsky FL, Miguel R, Saberski L. Pain management with regenerative injection therapy (RIT). In: *Pain management: A practical guide for clinicians*. Washington DC CRC Press; 2001;p. 381-402.
22. Cook CS, Smith PA. Clinical Update: Why PRP should be your first choice for injection therapy in treating osteoarthritis of the knee. *Curr Rev Musculoskelet Med* 2018;11(4):583-92. [Crossref](#)
23. Kingsley CS. Blood coagulation; evidence of an antagonist to factor VI in platelet-rich human plasma. *Nature* 1954;17;173(4407):723-4. [Crossref](#)
24. Matras H. Effect of various fibrin preparations on reimplantation in the rat skin. *Osterr Z Stomatol* 1970;67(9):338-59.
25. Ferrari M, Zia S, Valbonesi M, Henriquet F, Venere G, Spagnolo S, et al. A new technique for hemodilution, preparation of autologous platelet-rich plasma and intraoperative blood salvage in cardiac surgery. *Int J Artif Organs* 1987;10(1):47-50. [Crossref](#)
26. Sonnleitner D, Huemer P, Sullivan DY. A simplified technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate for intraoral bone grafting techniques: A technical note. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;15(6):879-82.
27. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: From pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol* 2009;27(3):158-67. [Crossref](#)
28. Anitua E. Plasma rich in growth factors: Preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14(4):529-35.
29. Kobayashi E, Flückiger L, Fujioka-Kobayashi M, Sawada K, Sculean A, Schaller B, et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Investig* 2016;20(9):2353-60. [Crossref](#)
30. Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, Vervelle A. Une opportunité en paro-implantologie: Le PRF. *Implantodontie* 2001;42:55-62.
31. He L, Lin Y, Hu X, Zhang Y, Wu HA. A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2009;108:707-13. [Crossref](#)



32. Ehrenfest DMD, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: From pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol* 2009;27(3):158-67. [Crossref](#)
33. Wang M, Li J, Liu J, Lin X, Xu W. The comparison of platelet-rich fibrin and platelet-rich plasma in releasing of growth factors and their effects on the proliferation and differentiation of adipose tissue-derived stem cells in vitro. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2012;30:641-4.9.
34. Choukroun J. Advanced PRF, &i-PRF: Platelet concentrates or blood concentrates. *J Periodont Med Clin Practice* 2014;1:3.
35. Christoffersson G, Vågesjö E, Vandooren J, Lidén M, Massena S, Reinert RB, et al. VEGF-A recruits a proangiogenic MMP-9-delivering neutrophil subset that induces angiogenesis in transplanted hypoxic tissue. *Blood* 2012;120:4653-62. [Crossref](#)
36. Mourão CFdAB, Valiense H, Melo ER, Mourão NBMF, Maia MD-C. Obtention of injectable platelets rich-fibrin (i-PRF) and its polymerization with bone graft. *Rev Col Bras Cir* 2015;42(6):421-23. [Crossref](#)
37. Sacco L. Lecture, International Academy of implant prosthesis and osteoconnection. *Lecture* 2006;12:4.
38. Rodella LF, Favero G, Boninsegna R, Buffoli B, Labanca M, Scari G, et al. Growth factors, CD34 positive cells, and fibrin network analysis in concentrated growth factors fraction. *Microsc Res Tech* 2011;74:772-7. [Crossref](#)
39. Biehl JK, Russell B. Introduction to stem cell therapy. *J Cardiovasc Nurs* 2009;24(2):98-103; quiz 104-5. [Crossref](#)
40. Weissman IL. The E. Donnall Thomas lecture: Normal and neoplastic stem cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14(8):849-58. [Crossref](#)
41. Hasty KA, Cho H. Stem cell considerations for the clinician. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 2016;27(4):855-70. [Crossref](#)
42. Banfi A, Muraglia A, Dozin B, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Quarto R. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Exp Hematol* 2000;28(6):707-15. [Crossref](#)
43. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315-7. [Crossref](#)
44. Gupta PK, Das AK, Chullikana A, Majumdar AS. Mesenchymal stem cells for cartilage repair in osteoarthritis. *Stem Cell Res Ther* 2012;9,3(4):25. [Crossref](#)
45. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am* 2005;87(7):1430-7. [Crossref](#)
46. Kokai LE, Marra K, Rubin JP. Adipose stem cells: biology and clinical applications for tissue repair and regeneration. *Transl Res* 2014;163(4):399-408. [Crossref](#)
47. Strioga M, Viswanathan S, Darinskas A, Slaby O, Michalek J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev* 2012;20;21(14):2724-52. [Crossref](#)
48. Ustunel I, Ozenci AM, Sahin Z, Ozbey O, Acar N, Tanriover G, et al. The immunohistochemical localization of notch receptors and ligands in human articular cartilage, chondroprogenitor culture and ultrastructural characteristics of these progenitor cells. *Acta Histochem* 2008;110(5):397-407. [Crossref](#)
49. Ozbey O, Sahin Z, Acar N, Ozcelik FT, Ozenci AM, Koksoy S, et al. Characterization of colony-forming cells in adult human articular cartilage. *Acta Histochem* 2014;116(5):763-70. [Crossref](#)
50. Koga H, Muneta T, Nagase T, Nimura A, Ju YJ, Mochizuki T, et al. Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: Suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit. *Cell Tissue Res* 2008;333(2):207-15. [Crossref](#)
51. Mushahary D, Spittler A, Kasper C, Weber V, Charwat V. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry A* 2018;93(1):19-31. [Crossref](#)
52. Cananzi M, Atala A, de Coppi P. Stem cells derived from amniotic fluid. In: Lanza R, Atala A, editors. *Essentials of stem cell biology*, 3rd ed. USA: Academic Press, Elsevier Inc 2014;p.141-56. [Crossref](#)
53. Joo S, Ko IK, Atala A, Yoo JJ, Lee SJ. Amniotic fluid-derived stem cells in regenerative medicine research. *Arch Pharm Res* 2012;35(2):271-80. [Crossref](#)
54. Müller M, Czarnecka J, Brzeziński M, Prus J, Kulak B, Hołubowski A, et al. Current stem cells technologies used in medicine. *Med J Cell Biol* 2021;8:124-38. [Crossref](#)
55. Centeno CJ, Pastoriza SM. Past, current and future interventional orthobiologics techniques and how they relate to regenerative rehabilitation: A clinical commentary. *Int J Sports Phys Ther* 2020;15(2):301-25. [Crossref](#)
56. Rossi G, Manfrin A, Lutolf MP. Progress and potential in organoid research. *Nat Rev Genet* 2018;19(11):671-87. [Crossref](#)
57. Asawa Y, Ogasawara T, Takahashi T, Yamaoka H, Nishizawa S, Matsudaira K, et al. Aptitude of auricular and nasoseptal chondrocytes cultured under a monolayer or three-dimensional condition for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2009;15(5):1109-18. [Crossref](#)
58. Capeling MM, Czerwinski M, Huang S, Tsai YH, Wu A, Nagy MS, et al. Nonadhesive alginate hydrogels support growth of pluripotent stem cell-derived intestinal organoids. *stem cell reports*. 2019;12(2):381-94. [Crossref](#)
59. Köse S, Kankilic B, Gizer M, Ciftci Dede E, Bayramli E, Korkusuz P, et al. Stem cell and advanced nano bioceramic interactions. *Adv Exp Med Biol* 2018;1077:317-42. [Crossref](#)
60. Wang X, Wenk E, Zhang X, Meinel L, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. Growth factor gradients via microsphere delivery in biopolymer scaffolds for osteochondral tissue engineering. *J Control Release* 2009;134(2):81-90. [Crossref](#)