



Kıkırdak doku mühendisliğinde yenilikler

Innovations in cartilage tissue engineering

Hasan Havıtcıoğlu^{1,2}

¹Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Ana Bilim Dalı, İzmir

²Dokuz Eylül Üniversitesi, Kemik-Kıkırdak Doku Biyoteknolojisi Uygulama ve Araştırma Merkezi (KEKDOB), İzmir

En sık görülen eklem hastalıklarından biri olan kıkırdak hasarları, birçok faktöre bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Eklem kıkırdağının herhangi bir hasar durumunda kendi kendini onarma yeteneği kan damarları, sinirler ve lenf damarlarından yoksun olması ve yeterli besin alamamasından dolayı sınırlıdır. Hasar gören kıkırdak dokusu bu zayıf iyileşme kapasitesinden ötürü yoğun ağrıya sebep olur ve zamanla da osteoartrit (OA) gelişebilir. Doku mühendisliği, hücrelerin, biyolojik olarak parçalanabilen malzemelerin ve büyüme faktörlerinin tek tek veya birlikte kullanımıyla gerçek dokuyu biyolojik olarak taklit edebilen, rejenerasyon sürecini iyileştiren yeni bir yaklaşımdır. Kıkırdak doku yenilenme yeteneğinin azlığı sebebiyle doku mühendisliğiyle ilgilenen araştırmacılar için çok önemli olmuştur. Ancak, en önemli konu da iskele-kıkırdak entegrasyonu ile ilgili sorunlardır. Son zamanlarda hücresel içerik, materyal ve biyomoleküler bileşiminin manipülasyonu yoluyla bu zorluğun üstesinden gelmek için birçok girişimde bulunulmuştur. Bu nedenle, bu derlemede sadece güncel tedavi stratejileri değil, aynı zamanda hücre-iskele yapıları ve etkileşimleri, hücresel tedavilerle mezenkimal kök hücreler ve biyomateryaller, ayrıca gelecekteki araştırmaları yönlendirecek olumlu yönler ve geriye kalan problemler üzerinde durulmuştur.

Anahtar sözcükler: kıkırdak; osteoartrit; doku mühendisliği

Cartilage damage, one of the most common joint diseases, occurs due to many factors. The ability of the articular cartilage to self-repair in case of any damage is limited because it lacks blood vessels, nerves and lymphatic vessels and does not get enough nutrients. Damaged cartilage tissue causes intense pain due to this poor healing capacity, and osteoarthritis (OA) may develop over time. Tissue engineering is a new approach that can biologically mimic real tissue by using cells, biodegradable materials and growth factors individually or in combination, improving the regeneration process. However, the most important issue is the problems of scaffold-cartilage integration. Recently, many attempts have been made to overcome this challenge through the manipulation of cellular content, material, and biomolecular composition. Therefore, this review focuses on not only current treatment strategies, but also cell-scaffold structures and interactions, cellular therapies, mesenchymal stem cells and biomaterials, as well as positive aspects and remaining problems that will guide future research.

Key words: cartilage; osteoarthritis; tissue engineering

KIKIRDAK DOKUSU VE HASARLARI HAKKINDA GENEL BİLGİ

Kıkırdak sinovyal eklemlerde, omurgada, kaburgalarda, dış kulaklarda, burunda ve solunum yollarında, çocukların ve ergenlerin büyüme plakalarında bulunan avasküler, anöral ve alenfatik bir bağ dokusudur. İnsanlarda hiyalin, fibröz ve elastik kıkırdak dokusu olarak üç ana türde mevcuttur.^[1] Her üç kıkırdak türünde, hücre dışı matrisin (*extra-cellular matrix*, ECM) ana bileşenlerini sentezleyen ve salgılayan düşük bir hücre yoğunluğuna (kondrositler) sahiptir.^[2,3]

Hiyalin kıkırdak camsı görünümüyle insan vücudundaki en yaygın görülen kıkırdak şeklidir. Eklem hiyalin kıkırdağı, 0,001-0,01 mertebesinde son derece düşük bir sürtünme katsayısına sahip kayganlaştırıcı bir yüzey sağlayarak eklem hareketlerine imkan verir.^[4,5]

Yapısal destek ve deformasyona karşı direnç sağlamak, biyomekanik işlevlerini yerine getirmek için, kıkırdak ECM'si, yüksek oranda hidratlı bir kollajen fibril ağı içine yerleştirilmiş benzersiz bir proteoglikan ailesi içerir. Buna ek olarak ıslak ağırlığının %60 ila %85'i kadar su bulunur.^[6] Bu matrisin kondrosit aracılığıyla sentezi ve

İletişim / Contact: Prof. Dr. Hasan Havıtcıoğlu • **E-posta / E-mail:** hasan.havitcioglu@deu.edu.tr

ORCID iD: Hasan Havıtcıoğlu, 0000-0001-8169-3539

Geliş / Received: 24 Kasım 2022 • **Revizyon / Revised:** 29 Kasım 2022, 20 Aralık 2022 • **Kabul / Accepted:** 21 Aralık 2022

montajı, sırayla, düzinelerce kollajen olmayan protein, proteoglikan ve glikoprotein senteziyle desteklenir. Kollajen ve proteoglikanların bolluğu, dağılımı ve türleri, üç kırıkdağın her birinde farklıdır ve bu da görünüm ve biyomekanik özelliklerde farklılıklara yol açar.^[7] Birçok farklı tipte kollajen molekülü eklem kırıkdağında mevcut iken temelini tip II kollajen oluşturmaktadır.^[8] Eklem kırıkdağında bulunan diğer kollajenler arasında tip III, tip IV, tip IX, tip X, tip XI, tip XII ve tip XIV bulunur.^[9,10]

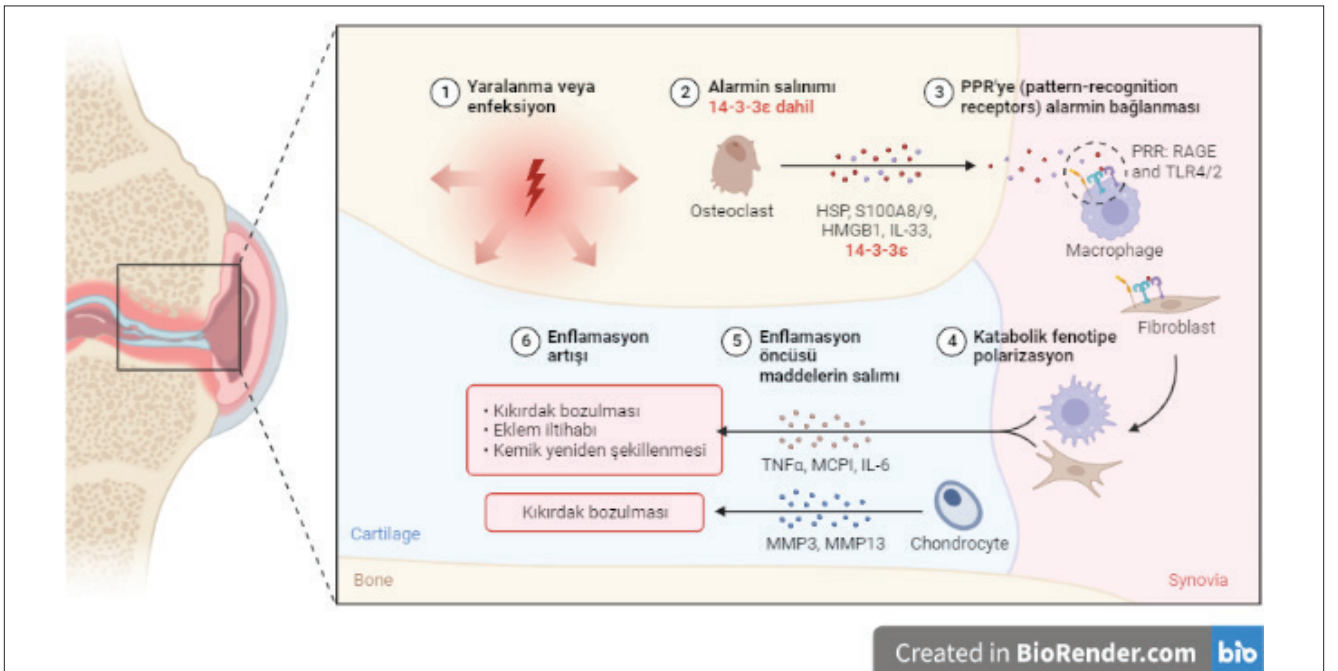
Eklem kırıkdağının ECM yapısı, subkondral kemiğe uygulanan baskıları azaltmasını ve şokları absorbe etmesini sağlarken aynı zamanda kemik hareketini kolaylaştıran kaygan bir yüzey oluşturur.^[11,12] Avasküler yapısı ve hücre sayısı azlığı nedeniyle düşük içsel iyileşme kapasitesi sergiler.^[13] Bu nedenle eklem kırıkdağının yaranması veya hasarı hastalarda ağrı ve hareket kaybıyla sonuçlanır ve tıbbi müdahale ihtiyacı gerekli olabilir. Kırıkdağ hasarının OA'ya dönüşme mekanizması Şekil 1'de gösterilmektedir. Farmasötik ve cerrahi tedavilerdeki sayısız denemeye rağmen, hasarlı kırıkdağ başarılı bir şekilde tamamen onarılamaz.^[14]

Cerrahi yaklaşım olarak uzun yıllardır sıkça kullanılmakta olan ve herkes tarafından bilinen otolog veya allojenik olarak tercih edilen en popüler yöntem greftlemedir. Bu yöntemde kişinin kendisinden (otogreft uygulaması) daha az yük alan bir bölgeden alınan kırıkdağ parçası hasarlı dokuya implante edilir. Ancak bu tedavi yöntemi hem hasarlı bölge dışında bir cerrahi girişim gerektirmekte hem de sonuçlar istenilen verimlilikte yenilenme göstermemektedir. Bu yöntem başka

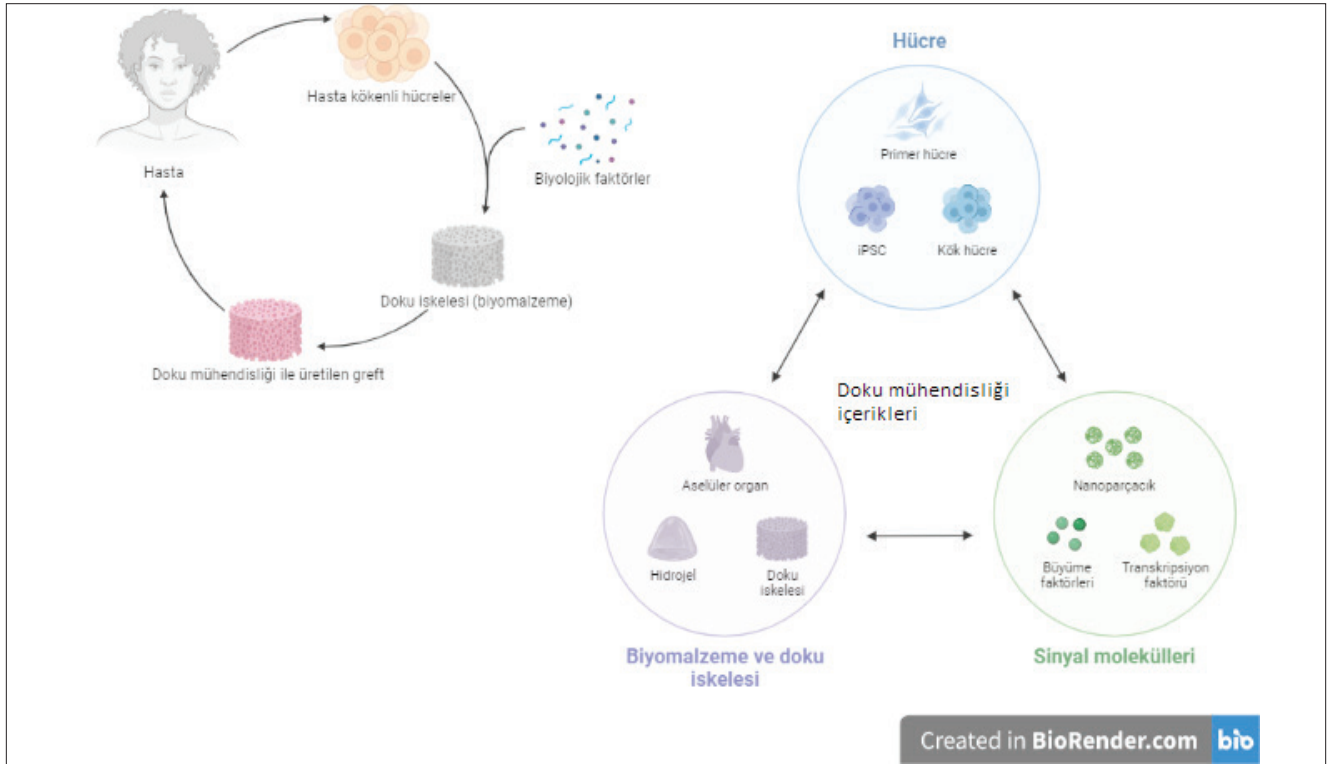
bir donörden alınan kırıkdağ parçası ile de uygulanabilir ancak bu versiyon immün reaksiyonlara ve dolayısıyla da doku reddine sebep olabilir.^[15] Bu nedenle cerrahlar daha etkili tedavi yöntemleri geliştirmeye çalışarak doku mühendisliği uygulamalarına yönelmiştir.

Doku mühendisliği; canlı hücreler, biyoaktif moleküller ve üç boyutlu gözenekli doku iskelelerinin bir kombinasyonunu kullanarak, kemik ve kırıkdağ doku rejenerasyonu için geleneksel tedavilerden daha umut verici bir alternatiftir.^[15] Şekil 2'de şematize edilmiş olarak doku mühendisliğinin temelini oluşturan bileşenler mevcuttur.

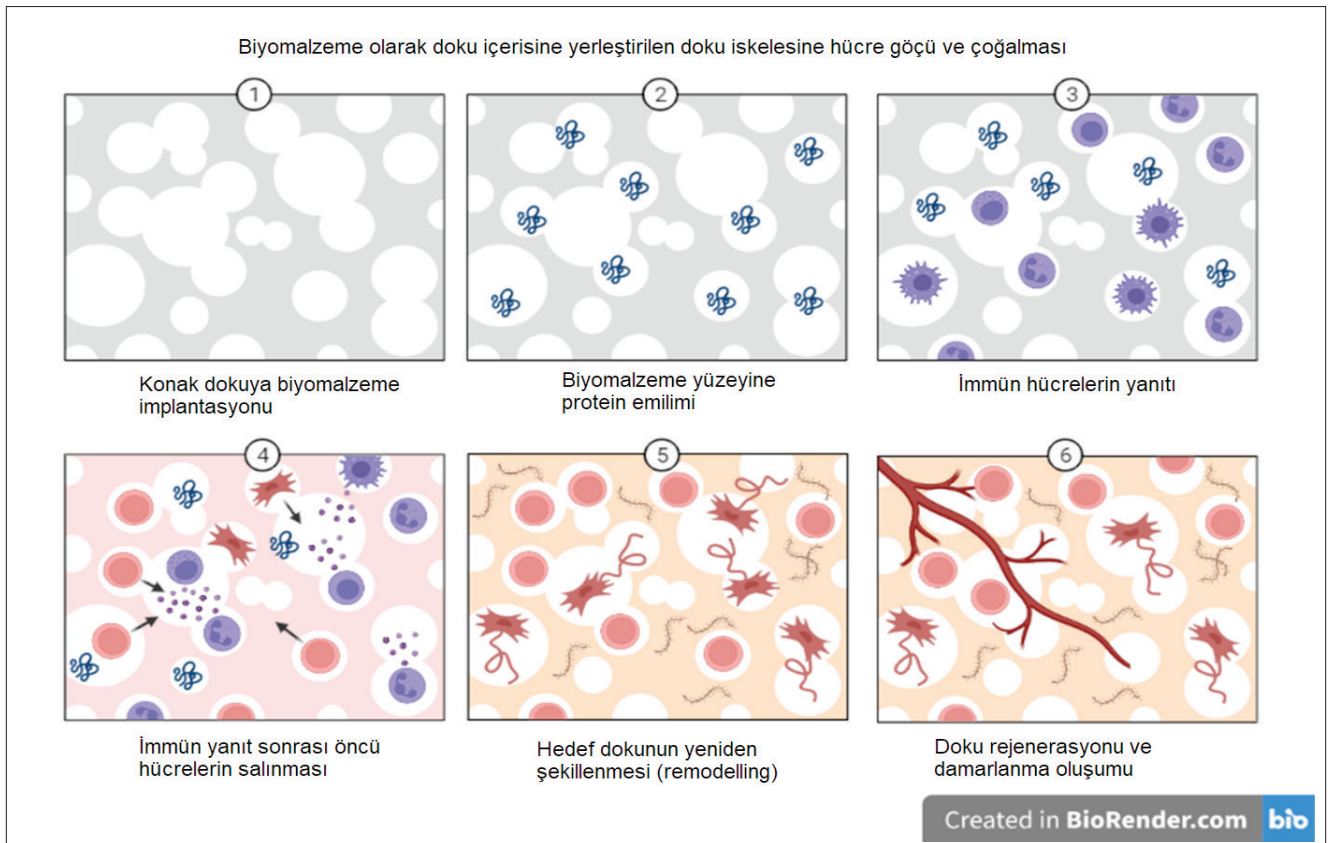
Kırıkdağ doku mühendisliği (*cartilage tissue engineering*, CTE), hücre büyümesini ve çoğalmasını desteklemek için eklem kondrositleri veya mezenkimal kök hücreler (*mesenchymal stem cells*, MSC) ve büyüme faktörleri (*growth factors*, GF) gibi ilgili hücreleri iskelelere yerleştirerek iyileşmeyi artırma potansiyeline sahiptir.^[16,17] Kollajen, jelatin, fibrin, ipek fibrin, aljinat, hiyalüronan, kondroitin sülfat, agaroz ve kitosan gibi doğal polimerler ve polietilen glikol, poli (laktid-ko-glikolik) asit (PLGA) ve polikaprolakton (PCL) gibi sentetik biyomateryaller sıklıkla bu alanda doku iskelesi üretiminde kullanılmaktadır.^[18,19] Bununla birlikte, doğal kırıkdağ ve yeni oluşan kırıkdağ doku arasındaki entegrasyon zorlu olmaya devam etmektedir, bu nedenle doku iskelesinin biyoaktivitesini arttıracak eklenmeler yapılmaya devam edilmektedir. Şekil 3'te hasarlı bir bölgeye doku iskelesi implante edildiğinde zaman içerisinde hücrelerin entegrasyonu ve vasküler yapının oluşması gösterilmektedir.



Şekil 1. Kırıkdağ hasarının osteoartrite dönüşme mekanizması.



Şekil 2. Doku mühendisliği yaklaşımı ve bileşenleri.



Şekil 3. Doku rejenerasyonu için biyomalzemelerin implantasyonu.

Uygun bir doku iskelesi, hücrelerin proliferasyonu ve tutunması için optimal bir mimari gerektirmektedir. Biyomalzemelerin yüzey kimyası, bileşimi, ECM'yi taklit edebilmesi, gözenek yapısı ve morfolojisi, ayrıca mekanik özelliklerinin hedef dokuya benzemesi kırık doku mühendisliğinde iskele üretiminde çok önemlidir. Üretilecek olan iskelenin doğal dokuyla biyomimik olarak benzemesi implantasyon sırasında entegrasyonu geliştirecektir.^[18]

KIKIRDAK HASARLARI İÇİN UYGULANAN GÜNCEL TEDAVİLER

Klinikte eklem kırıkdağı hasarlarında sıkça kullanılan otolog kondrosit implantasyonu (*autologous chondrocyte implantation*, ACI), mikrokırık oluşturma, trombosit zengin plazma (*platelet-rich plasma*, PRP) ve kök hücre tedavileri gibi yöntemler mevcuttur. Ancak bu yöntemlerin kendilerine göre avantaj ve dezavantajları olmasının yanı sıra hasar boyutu da tedavide önemli bir etkidir.^[20] Son yıllarda geliştirilen bazı yöntemler bu geleneksel sayılabilecek tedavilerin önüne geçmektedir.

Dünya çapında şirketler, OA veya travmanın neden olduğu kırıkdağ hasarlarını düzeltmek için onarıcı veya yenileyici özellikte hücre bazlı ürünler geliştirmeye odaklanmıştır. Bunu başarmak için farklı stratejiler uygulanmıştır. İyi bilinen ACI yöntemi, destekleyici bir matris veya doku iskelesi ürünü, yani matris ile ilişkili otolog kondrosit implantasyonu (MACI) içerecek şekilde geliştirilmiştir. Son zamanlarda, destekleyici matrisli veya destekleyici matris olmadan otolog veya allojenik kök hücrelerin intraartiküler enjeksiyon yoluyla uygulanmasını içeren ürünler de ortaya çıkarılmaktadır. Başka bir strateji ise, 3 boyutlu (*3-dimensional*, 3D) biyoyumlu hücreler ile destekli doku iskelelerini cerrahi olarak implante etmektir. Ancak, hücre bazlı tedaviler, katı düzenlemelere tabi tutulmaktadır.^[21]

Onaylanmış hücre bazlı ürünler (otolog kondrosit implantasyonu ürünleri) mevcuttur. Hâlihazırda onaylanan veya geliştirilmekte olan kondrosit bazlı ürünlerin çoğunluğu, artroskopik olarak toplanan kondrositlerin, ikinci bir prosedür sırasında implantasyondan önce bir matris veya iskele malzemesi içinde ekilerek matris ile uygulandığı ACI ürünleridir (JACC, MACI, Ortho-ACI, Spherex, Novocart 3D, Cartlife, vs.). Bu ürünler, bir sıvı hücre süspansiyonu ve bir peristomal flep veya Carticel ve ChondroCelect gibi bir kollajen membran kullanımını içermektedir.^[20]

Eklem kırıkdağının hasar görmesi eklem üzerinde daha fazla strese ve yapıda dizilim bozukluklarına neden olur. Bu nedenle erken dönemde teşhis konulursa yüklenmeyi azaltmak ve hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak için osteotomi yöntemi kullanılabilir. Bu yöntem

öncelikli olarak diz bölgesinde uygulanır ve eklem için koruyucu bir araç olarak kullanılabilir.^[22]

Eklem distraksiyonu ise iki yüzeyin birbirinden uzaklaştırılması sayesinde yüklenmeyi azaltmak için alanı arttıran, kemiklerin birbirinden ayrıldığı ve distraksiyon bölgesinin harici bir çerçeve kullanılarak sabitlendiği daha yeni bir tekniktir. Dejeneratif bölgeyi geçici olarak rahatlatırken bu yöntem ise genellikle ayak bileği ve dizdeki OA durumları için kullanılmıştır. Eklem distraksiyonunun hastalara kısa vadeli klinik ve yapısal faydalar sağladığı, dokuz yıla kadar etkisi olduğu gösterilmiştir.^[23]

Bunlara ek olarak, ağırlı subkondral kistlerin mevcut olduğu durumlarda subkondral plastiyle tedavi uygulanabilir. Kistlerin kalsiyum fosfatlar ve/veya kemik iliği konsantrleriyle doldurulması sağlanır. Bu sayede ağrı hafifletilerek iyileşme hedeflenmektedir.^[24]

TEDAVİDE KIKIRDAK DOKU MÜHENDİSLİĞİ YAKLAŞIMLARI

Kırıkdağ hasarlarında hücresel tedaviler, büyüme faktörleri ve doku iskeleleri kullanımı son yıllarda hız kazanmaktadır. Özellikle kırıkdağ hasarlarında uygulanan hücre tedavisi, klinik öncesi ve klinik ortamlarda büyük ölçüde araştırılmaktadır. Bu çalışmaların kısa vadeli sonuçları oldukça ikna edici olsa da, uzun vadede sadece minimal veya yüzey kırıkdağ yaralanması olan hastalar bu tedavilerden daha yüksek oranda fayda görmektedir.^[25]

Lv ve ark., *12-residue self-assembling peptide* (KLD12) ve *link protein N-peptide*, (KLPP) olmak üzere iki özel olarak tasarlanmış işlevselleştirilmiş kendi kendine birleşen peptid hidrojel kullanarak neo-kırıkdağ ile konakçı dokuyu entegre etmeye çalışmıştır. Bu peptitler, kondrosit ve kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre (*bone marrow-derived stem cells*, BMSC) göçünü indükleyen düşük sitotoksisiteye sahip işlevselleştirilmiş bir nano yapıya sahiptir. KLPP, in-vitro olarak KLD-12'ye karşı daha iyi performans göstermiştir.^[26]

Nie ve ark., eklem kırıkdağı onarımında *decellularized living hyaline cartilage graft*, (dLhCG) adında kırıkdağ doku mühendisliği ve hücreleştirme teknolojisinin avantajlarını birleştiren allojenik hiyalin kırıkdağ greftini geliştirmişlerdir. Domuz diz eklemine bu yapıyı implante ettikten sonra altı aylık izlemde, rejenerasyon benzeri kırıkdağlı yeni dokunun morfolojisi, bileşimi, fenotipi, mikro yapısı ve mekanik özellikleri histoloji, biyokimyasal testler, DNA mikrodizileri ve mekanik testler yoluyla gösterilmiştir. Allojenik dLhCG ile eklem kırıkdağı tedavilerinin vücutla uyumlu ve doğal kırıkdağla iyi entegre olduğu belirtilmiştir.^[27]

Park ve ark., bir tavşan modelinde üretmiş oldukları kondrosit sferoidlerinin onarıcı kapasitesini ve bu sayede ürettikleri ECM'yi incelemişlerdir. Yapılar, in-vitro olarak önemli ECM birikimi oluşumunu desteklerken, ayrıca in-vivo çevredeki kıkırdak dokularıyla mükemmel entegrasyon sergilemiştir.^[28] Buna ek olarak Gryadunova ve ark., ise siğir intervertebral disk eksplantlarına nazal kondrosit (*nasal chondrocyte*, NC) sferoidlerinin enjekte edilmesi ile minimal invaziv bir prosedürde nükleus pulposusunun (NP) rejenerasyonu için önemli bir çalışma sunmuştur.^[29]

Kıkırdak Doku Mühendisliğinde İn-vivo Uygulamalar

Li ve ark. membranla modifiye edilmiş mezenkimal kök hücrelerin (MSC), transglutaminaz-2 aşırı ekspresyonunun bir ayırt edici özellik olduğunu ve modifiye edilmiş MSC'ler ile bir anchor gibi kullanıldığı yaralanma bölgesine etkilerini araştırmıştır. Bu hedeflenen MSC taşınması, in-vivo kıkırdak hasarının onarımı için daha iyi histolojik skorlama ve gen ekspresyonu sonucu vermiştir.^[30]

Lu ve ark., kıkırdak rejenerasyonunu arttırmak için BMSC ile fonksiyonelleştirilmiş hücresiz matris türevli doku iskeleleri kullanmıştır. İskeleler, tavşanlarda tam kalınlıkta kıkırdak kusurlarına implante edilerek altı ay izlemeden sonra denekler sakrifiye edilmiştir. Oluşturulan defektlerin doğal dokuya benzer pürüzsüz bir yüzeye sahip neo-kıkırdak dokusu ile dolduğu gözlemlenmiştir.^[31]

Gong ve ark., tavşan modelinde osteokondral yaralanmanın onarımında çift katmanlı 3D baskılı doku iskelelerinin etkisini araştırmıştır. Üst ve alt katmanlar sırasıyla anti-enflamatuvar özellikteki interlökin-4 (IL4-) yüklü *Gelatin methacryloyl* (GelMA) ve *polycaprolactone* (PCL) with *hydroxyapatite* (HA)'dan oluşmaktadır. İnterlökin-4 yüklü yapılarda önemli ölçüde daha fazla doku entegre olduğu gözlemlenmiştir.^[32]

Sun ve ark. ise 3D biyo baskılı anizotropik yapıdaki PCL içeriğinde ikili büyüme faktörü kullanılarak üretilmiş [PLGA mikrokürelerinde dönüştürücü büyüme faktörü beta-3 (TGF-β3) ve kemik morfogenetik protein 4 (BMP4)] ve MSC yüklü hidrojellerden oluşan yapıların daha iyi kıkırdak rejenerasyonuna yol açtığını bildirmiştir. Tavşan modelinde diz kıkırdak hasarı üzerinde etkileri in-vivo olarak gözlemlenmiştir. Altı aylık takipte, araştırmacılar, kontrol grubuna kıyasla greftin çevreleyen dokuyla daha sağlam entegrasyonu sonuçlanan daha iyi mikrodamar oluşumunun yanı sıra makroskopik olarak da bu yapıların normal kıkırdakla benzerliği dikkat çekmiştir.^[33]

Doku İskeleleri ve Hidrojellerle Gerçekleştirilen Çalışmalar

PNIPAm, yapısında hem hidrofilik (amid kısmı) hem de hidrofobik (izopropil kısmı) bölgeleri içeren amfilik ısıya duyarlı bir polimerdir. Kwon ve Matsuda, kıkırdak dokusu onarımında kondrosit immobilizasyonu için ısıya duyarlı destek olarak PNIPAm ve PEG'den oluşan bir kompozit yapıyı kullanmışlardır. Bu 3D baskılı yapı, mükemmel hücre canlılığı ile hücre sayısında minimum bir azalma göstererek doğal kondrositlerin morfolojik özelliklerini korumuştur.^[34] Ma ve ark. ise enjekte edilebilir bir çözelti olarak metakrilat-polilaktit (MAPLA) ve 2-hidroksimetil metakrilat (HEMA) ile konjuge PNIPAm hidrojeli geliştirmişlerdir. Bu biyolojik olarak emilebilir ısıya duyarlı hidrojel, birkaç ay boyunca artan mekanik mukavemet altında bile hiçbir toksite göstermemiştir.^[35]

Bu çalışmaların uzun yıllardır devam etmesine ve ümit verici sonuçlar alınmasına karşılık, klinik uygulamalarda yer alabilecek ürünlere dönüşebilmesi oldukça yavaş gerçekleşmektedir. Bu çabaların bir başka dalı, gelecekteki atılımları mümkün kılacak bazı yeni heyecan verici teknolojilerin (örneğin, mikro fabrikasyon, 3D baskı) dahil edilmesi olmuştur.^[36]

Hafezi ve ark, 2021 yılında yayınlanan makalesinde, şimdiye kadar gerçekleştirilen çalışmalar ya yeni bir doku büyümesi sırasında mikro-çevresel ipuçlarını CTE için sağlamak, ya da orijinal dokunun biyokimyasal ve biyomekanik özelliklerini manipüle ederek kıkırdak benzeri yapıların iyileşmesini yönlendirmek için çok çeşitli hidrojeller ve hücre kaynakları kullanılmıştır. Mevcut kıkırdak tedavilerini güncellemek amacıyla, son yıllarda fibriler yapı oluşumlarından ve çapraz bağ atılarak iç yapısı güçlendirilmiş olan modifiye hidrojeller geliştirilerek in-vivo iyileşme amacıyla gerekli denemeler gerçekleştirilmektedir. Bu sayede hem kendi kendini yenileme potansiyeline sahip hem de kıkırdak hasarlarında implante edilebilecek ve dokudaki ağısı yapıyı taklit edebilen hidrojel sentezi alanında gelişmeler yaşanmaktadır.^[37]

Bir başka çalışmada (Campos ve ark, 2019) kondrosit fenotipinin korunması veya yeniden elde edilmesiyle ilgili zorluklar tartışılarak, doku iskeleleri üzerinde gerçekleştirilen in-vitro hücre kültürü incelemeleri anlatılmaktadır. Doğal ve sentetik biyomalzemelerin, gözenekli-fiber yapıda ve çok katmanlı olarak kullanıldığı çeşitli tasarımları ele almaktadır. Daha sonra ise, farklı hücrelerle ekimleri yapılmış olan iskelelerinin mekanik özelliklerini ve bu yapı iskelelerinin küçük hayvanlarda in-vivo implantasyonunun ardından, yapısal ve işlevsel olarak doğal dokuya benzeyen doku üretme açısından başarısını rapor etmektedirler.^[38]

Kıkırdak Doku Mühendisliğinde Genetik Yaklaşımlar

Bazı genlerin yeni oluşan, sağlıklı ve hastalıklı kıkırdakta ekspresyon düzeylerindeki farklılıkları CTE için üretilen doku iskelelerinin detaylı araştırmalarına da ışık tutmaktadır. Kabir ve ark. tarafından yayınlanan bir makalede, gen ekspresyon analizleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (*real time polymerase chain reaction*, RT-PCR) yöntemi ile yapılan çalışmalar incelenmiş olup onarım dokusundaki kondrojenik genleri saptamak için üç farklı çalışma değerlendirilmiştir.^[39] Bu çalışmalarda çoğunlukla kıkırdak için önemli olduğu kabul edilen COL2A1: COL1A1, ACAN, COL11A1, PRG4 ve SOX9 genleri kullanılmıştır.^[40,41] Bir çalışmada, tip II kollajen ve agrekan, embriyonik kök hücre, (*embryonic stem cell-ESC*)'den türetilen MSC'lerin BMP2 ve Wnt-5a tedavisini takiben, tedavi edilmemiş MSC'lere göre 10 kat daha fazla üsta-yarlanım edildiği gösterilmiştir.^[40] BM-MS-C'lerin, özellikle CD271'i eksprese edenlerin, plastik adheran BM-MS-C'lere kıyasla kondral defektlerde daha yüksek seviyelerde agrekan, tip II kollajen ve SOX9 gen ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir.^[41]

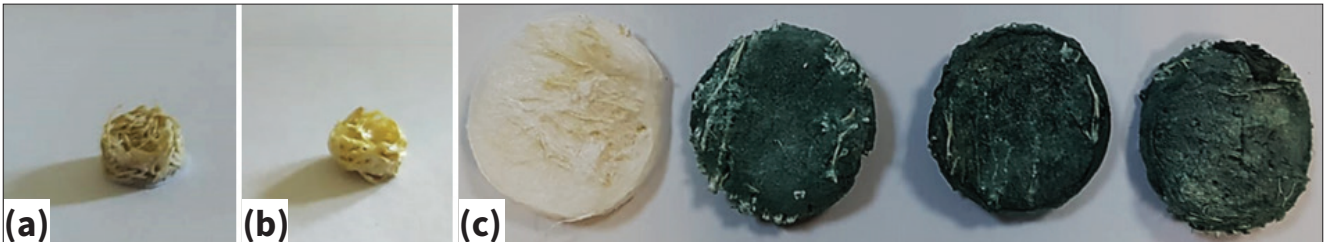
Çalışma Grubumuzla Gerçekleştirdiğimiz Kıkırdak Doku Mühendisliği Çalışmaları

Kıkırdak doku mühendisliği alanında kendi yapmış olduğumuz makalelere bakacak olursak; Çeçen ve ark. hidroksiapatit (HA), selüloz, poli-L-laktik asit (PLLA) ile kondrosit benzeri hücrelerle birleştirilmiş lif kabağı bazı iskelelerin biyouyumluluğunu ve biyomekanik özelliklerini araştırmıştır (Şekil 4). Doku iskelelerini karakterize etmek için taramalı elektron mikroskopu (SEM), mekanik çekme testi, enerji dağılımlı x-ışını spektrometrisi (EDS), diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) yöntemlerine başvurulmuştur. Kondrositlerin lif kabağı bazı iskeleler üzerindeki canlılığı XTT testleriyle analiz edilerek doku iskelelerinin metabolik olarak toksik özellik göstermediği bulunmuştur. Hematoksilen ve eozin (H&E), Masson trikrom, toluidin mavisi ve immünohistokimya yöntemleri ile elde edilen histolojik değerlendirmeler ise doku iskelelerindeki hücrelerin proteoglikan ve tip I-II kollajenleri tanımlayan hücre dışı matris ürettiği gösterilmiştir.^[42]

Kara ve ark. fiziksel, kimyasal ve enzimatik yöntemlerin bir kombinasyonu ile modifiye edilmiş bir hücresizleştirme yöntemiyle biyolojik fonksiyonel menisküs iskeleleri elde etmiştir. Bu amaçla, hücresizleştirme işlemi uygulanan ve karakterizasyonlarla doğrulanan yapılar tavşan mezenkimal kök hücrelerinden elde edilen fibroblast, kondrosit ve fibrokondrositlerden oluşan bir menisküs hücre popülasyonu ile yeniden hücreleştirilmiştir. Hücreleştirilmiş ve yeniden hücrelendirilmiş menisküs iskeleleri biyokimyasal, biyomekanik ve histolojik olarak analiz edilmiştir (Şekil 5). DNA, kollajen ve GAG içerikleri araştırılan çalışmada uygulanan hücresizleştirme yöntemlerinin yapısal ve biyokimyasal özelliklere sahip menisküs dokusunu taklit etmede etkili olduğunu gösterilmektedir.^[43]

Çok katmanlı yapıda üretilen menisküs doku iskelesinde, üst katman olarak poli 3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksivalerattan (PHBV), tibial platoya komşu olan alt katman olarak hidroksiapatit nano tozları ve stronsiyum ranelattan ve son olarak orta katmanda ise dayanıklı selüloz liflerinden türetilmiş lif kabağından yararlanılmıştır. Tavşanlarda bilateral medial menisküs ön boynuzunun avasküler bölgesinde 1,5 mm silindirik defekt oluşturulduktan sonra üç grup olarak karşılaştırma yapılmıştır. Bir gruba hasar uygulandıktan sonra hiçbir malzeme implante edilmeden kapatılmıştır. Diğer grupta üretilen doku iskeleleri implante edilmiştir. Son olarak hazır satılan poliüretan doku iskelesinden yararlanılmıştır. Tüm hayvanlar sekiz hafta sonra sakrifiye edilerek makroskopik, biyomekanik ve histolojik analizler için bilateral diz eklemleri alınmıştır. Hiçbir malzeme implante edilmeden boş bırakılan gruba kıyasla üretilen çok katmanlı iskelelerin üstün biyomekanik sonuçlar gösterdiği, ayrıca herhangi bir toksik etki göstermediği saptanmıştır.^[44]

Çolpankan Güneş ve ark. ipek fibroin ve genipin ile çapraz bağlı kitosan polimeri kullanarak biyolojik olarak uyumlu iskele üretmiştir. Morfoloji ve kimyasal yapıların karakterizasyonu için taramalı elektron mikroskopu (SEM) ve Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) kullanılmış, ayrıca yapı iskelelerinin mekanik özellikleri için basma testleri ile dinamik mekanik analizler-



Şekil 4.a-c. Lif kabağı temelli sol-gel ile PLA ve kitosan kaplanan (a), sol-gel yöntemi ile HAp ve kitosan kaplanan (b), genipin ile çapraz bağlanmış kitosan hidrojel doku iskelesi uygulaması (c).

den yararlanılmıştır. Ağırlıkça %0,3 ile çapraz bağlanmış hidrojel kompozit doku iskelesi bu karakterizasyonlar doğrultusunda seçilerek biyouyumluluğu araştırılmıştır. İskelelerin in-vitro analizleri için tavşan mezenkimal kök hücreleri ekilerek sitotoksitesite, canlılık, proliferasyon ve kollajen miktarları ölçülmüştür. Üretilen hidrojel kompozit doku iskelesinin kıkırdak dokusuna uyumlu olduğunu ve tavşan mezenkimal kök hücreleri üzerinde gelişmiş canlılık gösterdiği sonucuna varılmıştır.^[45]

Perpelek ve ark.'nın makalesinde kullanılan biyoaktif Helix aspersa ekstraktları (slime ve mukus), sert doku rejenerasyonu için gözenekli doku iskeleleri üretmek için kitosan (CHI) matrisiyle beraber kullanılmıştır. Fiziksel, kimyasal özellikler, antimikrobiyal aktivitenin yanı sıra kemik ve kıkırdak rejenerasyonu için in-vitro biyoaktivite ölçülmüştür. Mukus ve slime birleşimi, CHI matrisinin mekanik özelliklerini ve biyolojik bozunma oranını arttırmıştır. SEM görüntüleri, daha yüksek ekstrakt içeriği ile ortalama gözenek boyutunun azaldığını gösterirken, mukus ve slime ekstraktları, iki bakteri suşu üzerinde de antimikrobiyal etki göstermiştir. İskelelerin Saos-2 ve SW-1353 hücre hatları ile in-vitro sitotoksitesitesi, osteojenik ve kondrojenik aktiviteleri, ALP aktivitesi, biyomineralizasyon, GAG, COMP ve hidroksiprolin içeriği ölçülmüştür. Hücre canlılığı sonuçları, ekstraktların kontrol grubuyla karşılaştırıldığında Saos-2 ve SW1353 hücreleri üzerinde proliferatif bir etkiye sahip olduğunu gösterirken mukus ve slime yüklemesi osteojenik ve kondrojenik aktiviteyi de arttırmıştır.^[46]

Tamburacı ve ark. kıkırdak-kemik dokusu arayüzünü taklit etmek için farklı polimer katmanlarında takviye olarak Si-ikameli nanohidroksiapatit partikülleri (Si-nHap) ve silika bazlı POSS nano-kafesleri kullanmışlardır. Yaygın olarak kullanılan biyopolimerler olan kitosan ve zein, yapıyı taklit etmek için polimer katmanı olarak seçilmiştir. Kitosan/Si-nHap mikro gözenekli katman ve zein/POSS nanofiber katmanı, bir kemik-kıkırdak doku arayüzünü taklit edecek şekilde tasarlanmıştır. İki katmanlı doku iskeleleri, morfolojik, fiziksel ve mekanik özelliklerin belirlenmesi için SEM, basma analizi, şişme ve biyolojik bozunma testleriyle karakterize edilmiştir. Ayrıca, osteosarkom ve kondrosarkom hücre hatları kullanılarak LDH, proliferasyon, floresan görüntüleme ve ALP aktivite deneyleri ile in-vitro hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. ALP ekspresyon seviyeleri, Si katkılı nHap katkısının gelişmiş osteojenik potansiyel gösterdiğini ortaya koymuştur. Histolojik veriler, kıkırdak ve kemik arayüzünü taklit eden hem fiber hem de gözenekli tabakaların homojen hücre dağılımı ve matris oluşumu sergilediğini göstermiştir.^[47]

Sonuç olarak, kıkırdak doku mühendisliği gelişmekte olan bir alan olup çalışmalar devam etmektedir. Hâlen en sıklıkla uygulanan ileri derece kıkırdak doku hasarlarındaki implant cerrahisi yerine hücresel kıkırdak tedavileri, yapı iskeleli tedaviler ve hidrojeller zamanla daha fazla yer bulacaktır.

KAYNAKLAR

1. Wachsmuth L, Söder S, Fan Z, Finger F, Aigner T. Immunolocalization of matrix proteins in different human cartilage subtypes. *Histol Histopathol* 2006;21(5):477-85.
2. Stockwell RA. The cell density of human articular and costal cartilage. *J Anat* 1967;101(4):753-63.
3. Naba A, Clauser KR, Ding H, Whittaker CA, Carr SA, Hynes RO. The extracellular matrix: Tools and insights for the 'omics' era. *Matrix Biol* 2016;49:10-24. [Crossref](#)
4. Linn FC. Lubrication of animal joints. *J Bone Joint Surg Am* 1967;49(6):1079-98. [Crossref](#)
5. Charnley J. The lubrication of animal joints in relation to surgical reconstruction by arthroplasty. *Ann Rheum Dis* 1960;19(1):10-19. [Crossref](#)
6. Mow VC, Ratcliffe A, Poole AR. Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials* 1992;13(2):67-97. [Crossref](#)
7. Krishnan Y, Grodzinsky AJ. Cartilage diseases. *Matrix Biol* 2018;71-72:51-69. [Crossref](#)
8. Eschweiler J, Horn N, Rath B, Betsch M, Baroncini A, Tingart M, et al. The biomechanics of cartilage - An overview. *Life (Basel)* 2021;11(4):302. [Crossref](#)
9. Eyre DR, Weis MA, Wu JJ. Articular cartilage collagen: An irreplaceable framework? *Eur Cell Mater* 2006;12:57-63. [Crossref](#)
10. Melrose J, Shu C, Whitelock JM, Lord MS. The cartilage extracellular matrix as a transient developmental scaffold for growth plate maturation. *Matrix Biol* 2016;52-54:363-83. [Crossref](#)
11. Luo Y, Sinkeviciute D, He Y, Karsdal M, Henrotin Y, Mobasheri A, et al. The minor collagens in articular cartilage. *Protein Cell* 2017;8(8):560-72. [Crossref](#)
12. Detamore MS, Ph D. *HHS Public Access* 2016;4(1):29-39.
13. Tew S, Redman S, Kwan A, Walker E, Khan I, Dowthwaite G, et al. Differences in repair responses between immature and mature cartilage. 2001;391:142-52. [Crossref](#)
14. Jelodari S, Sadrabadi AE, Zarei F, Jahangir S, Azami M, Sheykhasan M, et al. Review article new insights into cartilage tissue engineering: Improvement of tissue-scaffold integration to enhance cartilage regeneration. *Biomed Res Int* 2022;2022:7638245. [Crossref](#)
15. Olov N, Bagheri-Khoulanjani S, Mirzadeh H. Injectable hydrogels for bone and cartilage tissue engineering: a review. *Prog Biomater* 2022;11(2):113-135. [Crossref](#)

16. Francis SL, Di Bella C, Wallace GG, Choong PFM. Cartilage tissue engineering using stem cells and bioprinting technology - barriers to clinical translation. *Front Surg* 2018;5:70. [Crossref](#)
17. Nukavarapu SP, Dorcenus DL. Osteochondral tissue engineering: Current strategies and challenges. *Biotechnol Adv* 2013;31(5):706-21. [Crossref](#)
18. Balakrishnan B, Banerjee R. Biopolymer-based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Chem Rev* 2011;111(8):4453-74. [Crossref](#)
19. Vega SL, Kwon MY, Burdick JA. Recent advances in hydrogels for cartilage tissue. *2017*;33:59-75. [Crossref](#)
20. Evenbratt H, Andreasson L, Bicknell V, Brittberg M, Mobini R, Simonsson S. Insights into the present and future of cartilage regeneration and joint repair. *Cell Regen* 2022;11(1):3. [Crossref](#)
21. Reisman M, Adams KT. Stem cell therapy: A look at current research, regulations, and remaining hurdles. *P T* 2014;39(12):846-57.
22. Mina C, Garrett WE, Pietrobon R, Glisson R, Higgins L. High tibial osteotomy for unloading osteochondral defects in the medial compartment of the knee. *Am J Sports Med* 2008;36(5):949-55. [Crossref](#)
23. Goh EL, Lou WCN, Chidambaram S, Ma S. The role of joint distraction in the treatment of knee osteoarthritis: A systematic review and quantitative analysis. *Orthop Res Rev* 2019;11:79-92. [Crossref](#)
24. Szwedowski D, Dallo I, Irlandini E, Gobbi A. Osteo-core plasty: A minimally invasive approach for subchondral bone marrow lesions of the knee. *Arthrosc Tech* 2020;9(11):1773-77. [Crossref](#)
25. Hulme CH, Perry J, McCarthy HS, Wright KT, Snow M, Mennan C, et al. Cell therapy for cartilage repair. *Emerg Top Life Sci* 2021;5(4):575-89. [Crossref](#)
26. Lv X, Sun C, Hu B, Chen S, Wang Z, Wu Q, et al. Simultaneous recruitment of stem cells and chondrocytes induced by a functionalized self-assembling peptide hydrogel improves endogenous cartilage regeneration. *Front Cell Dev Biol* 2020;8:864. [Crossref](#)
27. Nie X, Chuah YJ, Zhu W, He P, Peck Y, Wang DA. Decellularized tissue engineered hyaline cartilage graft for articular cartilage repair. *Biomaterials* 2020;235:119821. [Crossref](#)
28. Park IS, Jin RL, Oh HJ, Truong MD, Choi BH, Park SH, et al. Sizable scaffold-free tissue-engineered articular cartilage construct for cartilage defect repair. *Artif Organs* 2019;43(3):278-87. [Crossref](#)
29. Gryadunova A, Kasamkattil J, Gay MHP, Dasen B, Pelttari K, Mironov V, et al. Nose to Spine: Spheroids generated by human nasal chondrocytes for scaffold-free nucleus pulposus augmentation. *Acta Biomater* 2021;134:240-51. [Crossref](#)
30. Li H, Jin Y, Zhao Y, Li W, He Z, Zhang Q, et al. Targeted cell therapy for partial-thickness cartilage defects using membrane modified mesenchymal stem cells by transglutaminase 2. *Biomaterials* 2021;275:120994. [Crossref](#)
31. Lu J, Shen X, Sun X, Yin H, Yang S, Lu C, et al. Increased recruitment of endogenous stem cells and chondrogenic differentiation by a composite scaffold containing bone marrow homing peptide for cartilage regeneration. *Theranostics* 2018;8(18):5039-58. [Crossref](#)
32. Gong L, Li J, Zhang J, Pan Z, Liu Y, Zhou F, et al. An interleukin-4-loaded bi-layer 3D printed scaffold promotes osteochondral regeneration. *Acta Biomater* 2020;117:246-60. [Crossref](#)
33. Sun Y, You Y, Jiang W, Wang B, Wu Q, Dai K. 3D bioprinting dual-factor releasing and gradient-structured constructs ready to implant for anisotropic cartilage regeneration. *Sci Adv* 2020;6(37):1422. [Crossref](#)
34. Rana MM, De La Hoz Siegler H. Tuning the properties of pni-pam-based hydrogel scaffolds for cartilage tissue engineering. *Polymers (Basel)* 2021;13(18):3154. [Crossref](#)
35. Ma Z, Nelson DM, Hong Y, Wagner WR. Thermally responsive injectable hydrogel incorporating methacrylate-poly lactide for hydrolytic lability. *Biomacromolecules* 2010;11(7):1873-81. [Crossref](#)
36. Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML. Tissue engineering and regenerative medicine: History, progress, and challenges. *Annu Rev Chem Biomol Eng* 2011;2:403-30. [Crossref](#)
37. Hafezi M, Nouri Khorasani S, Zare M, Esmaeely Neisiany R, Davoodi P. Advanced hydrogels for cartilage tissue engineering: Recent progress and future directions. *Polymers (Basel)* 2021;13(23):4199. [Crossref](#)
38. Campos Y, Almirall A, Fuentes G, Bloem HL, Kaijzel EL, Cruz LJ. Tissue engineering: An alternative to repair cartilage. *Tissue Eng Part B Rev* 2019;25(4):357-73. [Crossref](#)
39. Kabir W, Di Bella C, Jo I, Gould D, Choong P. Human stem cell based tissue engineering for in vivo cartilage repair: A systematic review. *Tissue Eng Part B Rev* 2021;27(1):74-93. [Crossref](#)
40. Gibson JD, O'Sullivan MB, Alaei F, Paglia DN, Yoshida R, Guzzo RM, et al. Regeneration of articular cartilage by human ESC-derived mesenchymal progenitors treated sequentially with BMP-2 and Wnt5a. *Stem Cells Transl Med* 2017;6(1):40-50. [Crossref](#)
41. Mifune Y, Matsumoto T, Murasawa S, Kawamoto A, Kuroda R, Shoji T, et al. Therapeutic superiority for cartilage repair by CD271-positive marrow stromal cell transplantation. *Cell Transplantation* 2013;22(7):1201-11. [Crossref](#)
42. Çeçen B, Kozacı LD, Yüksel M, Üstün O, Ergur BU, Havıtcıoğlu H. Biocompatibility and biomechanical characteristics of loofah based scaffolds combined with hydroxyapatite, cellulose, poly-L-lactic acid with chondrocyte-like cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2016;69:437-46. [Crossref](#)
43. Kara A, Koçtürk S, Bilici G, Havıtcıoğlu H. Development of biological meniscus scaffold: Decellularization method and recellularization with meniscal cell population derived from mesenchymal stem cells. *J Biomater Appl* 2021;35(9):1192-207. [Crossref](#)

44. Demirkıran ND, Havıçioğlu H, Ziylan A, Cankurt Ü, Hüsemođlu B. Novel multilayer meniscal scaffold provides biomechanical and histological results comparable to polyurethane scaffolds: An 8 week rabbit study. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2019;53(2):120-8. [Crossref](#)
45. Çolpankan Güneş O, Özer İ, Kara A, Ziylan A, Havıçioğlu H. Lif kabağı takviye edilmiş kitosan-ipek hidrojel kompozit doku iskelelerinin kıkırdak doku hasarı tedavisinde kullanımının araştırılması. *DEU Muhendis Fak Fen ve Muhendis Derg* 2021;23(69):937-50. [Crossref](#)
46. Perpelek M, Tamburacı S, Aydemir S, Tihminliođlu F, Baykara B, Karakaşlı A, et al. Bioactive snail mucus-slime extract loaded chitosan scaffolds for hard tissue regeneration: The effect of mucoadhesive and antibacterial extracts on physical characteristics and bioactivity of chitosan matrix. *Biomed Mater* 2021;16(6). [Crossref](#)
47. Tamburacı S, Çeçen B, Üstün O, Ergür BU, Havıçioğlu H, Tihminliođlu F. Production and characterization of a novel bilayer nanocomposite scaffold composed of chitosan/si-n-Hap and zein/POSS structures for osteochondral tissue regeneration. *ACS Appl Bio Mater* 2019;2(4):1440-55. [Crossref](#)