

# Menisküs Cerrahisinin Geleceği; Menisküs Doku Mühendisliği

## *Future of Meniscus Surgery; Meniscus Tissue Engineering*

Mehmet Akif ALTAY<sup>1</sup>, Baki Volkan ÇETİN<sup>1</sup>

1 Harran Üniversitesi Ortopedi ve Travmatoloji A.D., Şanlıurfa,

**Yazışma Adresi:** Doç. Dr. Mehmet Akif ALTAY-Harran Üniversitesi Ortopedi ve Travmatoloji A.D., Şanlıurfa  
+90 4143184005 e-mail:[maltay63@yahoo.com](mailto:maltay63@yahoo.com)

**Geliş tarihi / Received:** 21/03/2017

**Kabul tarihi / Accepted:** 04/08/2017

### Öz.

Son yıllarda yapılan bilimsel çalışmalarla diz eklemi için menisküslerin anatomik, biyomekanik ve fonksiyonel önemi ortaya konmuştur. Menisküs, eklemin hayati bir parçası olarak eklem kıkırdağının bozulmasını ve osteoartit gelişimini engellemektedir. Günümüz onarım teknikleri menisküsün periferik vaskülarize bölgesindeki sınırlı lezyonlarda etkili olmaktadır. Fonksiyonu, eklem fonksiyonuyla direkt ilişkili merkezi avasküler bölge lezyonunun tedavisi ise ciddi bir sorun olarak bulunmaktadır.

Tüm yaş grupları özellikle çocuklar artan şekilde daha zorlu, yarışmalı ve hatta profesyonel sporlarla uğraşmaktadır. Bunun sonucu olarak menisküs cerrahisi daha genç yaşlarda uygulanmakta ve uzun yaşam süreci içerisinde daha az sağlam menisküs dokusu korunabilmektedir. Genç ve aktif hastalarda parsiyel mediyal menisektomi sadece mekanik aksı hafifçe varusa kaydırsa da diz dengesinin bozulmasında başlangıç noktası olacaktır. Bozulan diz dengesi ve artan yüklenmenin ardından kaçınılmaz bir şekilde osteoartit gelişimine neden olmaktadır. Bu yüzden genç ve orta yaş hastalar için yeni rejeneratif stratejilere ihtiyaç olduğu açıktır.

Bugüne kadar belli ölçüde menisküs lezyonlarının restorasyonu anatomik ve fonksiyonel bütünlüğünün sağlanması için invitro menisküs yapısı elde etmeye yönelik farklı yaklaşım ve stratejiler denenmiştir.

Uygun hücre kaynaklarının seleksiyonu (otolog, allogenik, ksenogenik ve kök hücreler) menisküs onarım mühendisliğinde anahtar noktalardan biridir. Ayrıca çeşitli skafoldlar geliştirilmiştir. Bunlar deneysel ve klinik çalışmalarla üretilmekte ancak bazı problemlerde beraberinde gelişmektedir (stresi perdeleme, degradasyon sonucu meydana gelen yan ürünler vb). Bu problemler yeni stratejilerin geliştirilme ihtiyacını doğurmuştur. Skafoldsuz yaklaşımlar, kendi kendine toplanarak (self – assembly) çoğalma, birçok kimyasal/biyokimyasal ve mekanik uyarının, ayrıca gen terapisinin de fonksiyonel yeni doku formasyonu oluşumundaki yeri araştırılmıştır.

Bu yazı yeni menisküs rejenerasyon stratejilerine olan ihtiyacı ortaya koyacak şekilde günümüzdeki son duruma bir bakış sağlarken geleceğe yönelik yapılması gerekli çalışmalar hakkında klinisyene fikir vermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Menisküs, Cerrahi, Doku

**ABSTRACT**

In recent years scientific researches have established the anatomical, biomechanical, and functional importance that the meniscus holds within the knee joint. As a vital part of the joint, meniscus acts to prevent the degeneration of articular cartilage, and the development of osteoarthritis. Current repair techniques are only effective in treating lesions located in the peripheral vascularized region of the meniscus. Healing lesions found in the inner avascular region, which functions directly related to joint function, is considered to be a significant challenge.

All age groups and in particular children increasingly participate in more extreme, competitive or even professional sports. The consequence of this fact is that meniscal surgery is performed at a younger age, and less meniscus tissue is preserved for a lifetime period. In young, active patients a partial medial meniscectomy will be the starting point for a disturbed homeostasis of the knee, even if the mechanical axis is only slightly varus aligned. This altered knee homeostasis and increased loading inevitably leads to the development of osteoarthritis. Therefore there is a clear need for regenerative strategies in these young and middle aged patients. So far, different

approaches and strategies have contributed to the in vitro generation of meniscus constructs, which are capable of restoring meniscal lesions to some extent, both functionally as well as anatomically. The selection of the appropriate cell source (autologous, allogeneic, or xenogeneic cells, or stem cells) is regarded as one of key points for meniscal tissue engineering. Furthermore, a large variation of scaffolds for tissue engineering have been proposed and produced in experimental and clinical studies although a few problems with these (byproducts of degradation, stress shielding). Problems have shifted research interest toward new strategies (scaffoldless approaches, self-assembly). A large number of different chemical/biochemical and mechanical stimuli and also gene therapy have been investigated, in terms of encouraging functional tissue formation. In this review, we will give an overview on the need of research for meniscus regeneration, and provide a perspective, from the clinician's standpoint, for designing future regenerative strategies.

**Key words:** Meniscus, Surgery, Tissue

## 1. Menisküs doku mühendisliğinde (MDM)

### hücre kaynakları

#### ✓ Otolog hücreler

*Doku mühendisliğindeki en önemli hedef doğal dokunun yerine onun fonksiyonunu görebilecek dokunun üretilmesidir* (1). Araştırmalarda **orijinal menisküs dokusuyla** biyomimetik ürünün geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bunun için biyolojik olarak eriyebilen skafold üzerine yerleştirilen doğal menisküs hücreleri yoluyla fibrokırdak Ekstra Sellüler Matriksin (ESM)

üretilmesi amaçlanır (2). Ancak sadece menisküsün iç bölgesinden elde edilen hücreler yeterli matriks glikozaminoglikanlarını (GAG) üretebilmektedir (3). Mevcut tekniklerle belirli sayıda hücre izole edilebilmektedir. Bu problemi aşmak amacıyla çalışmalar **otolog menisküs hücrelerinin** tek tabakalı kültür ortamında çoğaltılmasına yoğunlaşmıştır bu da ESM gen ekspresyonunun baskılanmasıyla sonuçlanmıştır (4). Benzer şekilde **otolog kondrositler** kullanılmıştır. Bu hücrelerin daha fazla GAG ve

kollajen tip II ürettikleri bilinmektedir (2,5). Ancak bu hücrelerde diferansiye (dejenere olması veya yaşlanma dönemine girmesi) olmaktadır. *Bu sebeplerden MDM için başka hücre kaynaklarının araştırılması ihtiyacını ortaya çıkarmıştır.*

#### ✓ **Allojenik ve ksenojenik hücre kaynakları**

İlk çalışmalarda geniş bir hayvan modelinde, **allojenik artiküler, auriküler ve kotsal kondrositler** menisküs avasküler bölge lezyonlarında iyileşmeye pozitif etkisi gösterilmiştir (6). **Ksenojenik hücrelerin** kullanımıyla ilgili de artan sayıdaki çalışma bulunmaktadır. Ramallah ve ark. (7), 30 tavşan femoral kondilinde kıkırdak defekti oluşturmuş. Defekt alanına domuzdan alınarak kültüre edilmiş kondrositleri infüzyon yolu ile uygulamıştır. 24 saat sonra eklem kıkırdağına uyum sağladığı görülmüş, ölçülebilir bir immun cevap saptanmamıştır.

#### ✓ **İnsan embriyonik kök hücreleri (hEKH)**

Hasarlı dokuların (eklem kıkırdağı, menisküs, intervertebral disk, temporomandibular eklem ve kalp kası) rejenerasyonu için kök hücrelerin kullanımı güncel ilgi alanıdır (8). hEKH'lerin pluripotent olmaları ve sınırsız çoğalma kapasiteleri nedeniyle doku mühendisliğinde kullanılacak ideal hücre kaynağı olabileceği düşünülmüştür (8). Bu konuda önemli bir adım Hoben tarafından atılmıştır. Bu çalışmada hEKH'ler büyüme faktörleriyle ve/veya primer

hücrelerle (kondrosit, fibrokondrositler) kültüre edilmişlerdir. Kültür süresi sonunda hücrelerin yüzey markerlarına bakılarak GAG ve kollajen üretme kapasiteleri değerlendirilmiştir. Bu tedavi şemalarının karşılaştırılması sonucunda **TGF- $\beta$ 3** ve **BMP-4 kombinasyonunun** tip I, II, VI kollajen üretme kabiliyetinde olduğu ve 6.7 ve 4.8 kat fazla GAG ve kollajen üretebildiği gösterilmiştir. Ayrıca **fibrokondrositlerle** yapılan co-kültürlerde 9.8 kat fazla kollajen üretimi saptanmıştır. Bu çalışma sonunda hEKH temelli en az 3 farklı efektif stratejiyle fibrokıkırdak doku üretilebileceği gösterilmiştir (9).

#### ✓ **Adult (yetişkin) kök hücreler – Mezanşimal Kök Hücreler (MKH)**

**MKH'ler**; stromal orjinli multipotent progenitor hücrelerdir ve yetişkin ve fetüsün farklı dokularından izole edilebilmekle birlikte asıl temel kaynağı yetişkin kemik iliğidir (10). MKH'ler mezanşimal doku üretimi yapabilecek (kıkırdak, kemik, ligament, kas, yağ, dermal ve diğer bağ doku) hücelere farklılaşabilirler (11). MKH'ler çok çeşitli immun regülatör molekülleri üretebilir ve iyileşme sürecine katkıda bulunabilecek parakrin trofik mediyatörleri salgılayabilir (12).

MKH temelli tedavinin farklı stratejilerle uygulandığını literatürde görüyoruz: **Lokal MKH'nin insitu aktivasyonu**yla migrasyon, proliferasyon ve farklılaşmasının incelenmesi. Bu asellüler skafold transplantasyonu (13) yoluyla

veya VEGF gibi MKH fonksiyonlarını stimule eden büyüme faktörlerinin lokal uygulanması şeklinde yapılmıştır (14).

Bir diğer yöntem **otolog MKH' nin lokal uygulamasıyla** travma, dejenerasyon veya bozulmuş vaskülarite sonucu hasarlanmış lokal hücre popülasyonunun artırılmasıdır. Günümüzde birçok cerrah bu metodu kullanarak yüksek etkinlik, düşük risk ve maliyet elde etmektedir. Bu yaklaşımla birkaç temel teknik geliştirilmiştir. Bunlar içinde;

- 1. Vasküler geçiş sağlayan tüneller oluşturmak (Abrasyon Terapisi);** menisküsün vasküler bölgesinde tüneller oluşturacak şekilde delinerek kan ve beraberinde MKH'lerin hasarlanmış avasküler bölgeye sızmasına olanak verilir (15,16).
- 2. Vaskülarize sinovyal flapler veya fibrin pıhtısı** aynı mantık temelinde kullanılır (17,18). Literatürde sonuçlarda tam bir tutarlılık olmadığı görülür.

**Çoğaltılmış veya modifiye edilmiş MKH;** ilk girişim 2005'te Izuta tarafından yapılmıştır. *Otolog Kemik İliği Kökenli MKH'ler(Kİ-MKH)*(yeşil floresan protein transgenik farelerden elde edilen) izole edilerek tek tabakalı kültürde çoğaltılmış ve avasküler bölgede bulunan meniskal defekt alanına transplante edilmiş. 8 hafta sonra izlemlerde MKH'lerin canlı olduğu ve menisküs yırtığı içinde çoğaldığı ve fazla miktarda ESM üretimiyle beraber

avasküler bölgenin iyileşmesine yardımcı olduğu görülmüştür (19). Aynı doğrultuda *MKH'ler skafold üzerine ekilmiş* ve efektif sonuçlar elde edilmiştir (20). *MKH'nin invitro çoğaltılmasının primer avantajı* hücre sayısının artırılmasıdır. *Dezavantajları ise,* kültür sırasında olası hücre enfeksiyonu, implantasyon öncesi proliferasyon kapasitesinin azalmasıdır (21). Bir diğer tehlike (literatürde belirgin raporlanmamasına rağmen) tümör benzeri oluşumlardır.

MDM açısından MKH'ler çok önemli hücrelerdir. MKH'ler farklı anatomik bölgelerden alınmış ve hayvan modellerinde kültür/dağılım teknikleri ile incelenmiştir. MKH'in intrinsik terapötik potansiyeli direk/indirek olarak menisküs iyileşmesine katkıda bulunmaktadır. Menisküs dokusunun kompleks olması, parsiyel vaskülaritesi, türler arası menisküsün değişkenliği, doku içindeki farklı hücre tipleri gibi nedenlerle çok az teknik klinik uygulamada yer bulmuştur (22). Günümüzde en iyi MKH kaynağı ve optimum uygulanma şekli halen araştırılmaktadır.

## **2. MDM'de Skafold (model iskelet) kullanımı İdeal menisküs implantında olması gerekli 3 önemli özellik;**

- 1. Mekanik özellik;** heterojen yüklenmeye maruz kalan menisküsün mekanik özellikleri, doku anizotropisi, geometrisi, hibridizasyon özelliklerini içerir (23).
- 2. Biyoaktivite;** hücre fenotipinin sürdürülebilirliği, ESM üretiminin

uyarılması, immun cevabın oluşmaması ve konak –doku uyumunu sağlaması olarak tanımlanabilir.

3. *Şekil-Yapı özelliği*; kolay şekillendirilen, kolay elde edilen, işlenebilir, sterilizasyon ve cerrahi implantasyona uygun olmalıdır.

Skafoldlar 4 sınıfa ayrılabilir;

1. *Sentetik polimerler*, vücutta bulunmaz, en azından polimer formunda bulunmazlar.

2. *Hidrojel*, hidrofilik kolloidler olup geniş miktarda su tutabilme kapasitesindedirler. Doğal veya sentetik yoldan elde edilebilirler.

3. *ESM komponentli skafoldlar*, primer olarak kollajen ve hyalüronan gibi doğal matriksin makromoleküllerini içerirler.

4. *Doku kaynaklı materyaller*, hücre içermeyen ESM ve ayrıca ince barsak submukozası gibi canlı doku parçaları içerir.

Her skafold farklı üstün özellikler içerirler. Bu nedenle hibrid ve kompozitler oluşturulmuştur. Hücre ekili polimerler asellüler skafoldlara göre rejeneratif kapasite açısından daha üstündür (1).

### 1. Sentetik polimer skafoldlar

Sentetik polimerler; poliüretan (PU), polikaprolakton(PCL), Polilaktik asit (PLA), Poliglikolik asit (PGA) ve Polilaktik-glikolik asit (PLGA) vb. Bir çok farklı şekilde üretebilirler, elde edilmeleri kolaydır ve uygun por boyutları, lif boyutları, mekanik özellikleri ve uygun geometrinin sağlanabildiği bir gruptur. Bu avantajlara karşılık, minimal intrinsik

biyomimetik ve biyoaktif özellikler zayıf özellikleridir. Gelişmelere rağmen sentetik polimer skafoldların temel dezavantajı *fonksiyonel olarak sağlam bir matriks geliştirmeden önce invivo meydana gelen skafold degradasyonudur*. Çözülmesi gerekli bir başka sorunda *sentetik polimer yapının konak dokuyla olan uyumudur* (1).

### 2. Hidrojel Skafoldlar

Hidrojel, poli N-izopropilakrilamit (PNIPAAm) gibi sentetik materyal olabileceği gibi Alginat gibi doğal materyalde olabilir. Genellikle %90'dan fazla olan su içeriği hidrojinin fiziksel özellikleri belirlemek açısından önemlidir. Hidrojeller ayrıca çok yönlüdür. Bir çok metodla birlikte kullanılabilir (24). Jel formu reversibldir (25). Hücrelerle ve büyüme faktörleriyle şekillenebilir (26,27). Hidrojellerin kimyasal fonksiyonel yapısı daha doğal mikro ortam oluşturmak için kullanılmıştır. Hidrojeller çevresel faktörlere (ısı, pH, elektriksel yük, ultrasound veya tuz konsantrasyonu) cevap olarak reversibil jel özelliğindedir. Bu özellik "**Akıllı Biyomateryal**" adı verilen enjektabil skafoldların geliştirilebilmesine olanak vermiştir. Böylece sıvı şekilde enjekte edilerek vücutta katı hale gelebilecektir (25,28).

Hidrojel farklı bir skafold sınıfı sunmuşlardır. Fakat *mekanik özellikleri* (özellikle gerilim) ve *biyoaktivitesinin* (özellikle menisküs hücre fenotipi ve ESM sentezi) geliştirmeleri gerekmektedir. İleri çalışmalar ESM

moleküllerinin biyoaktif özelliklerini kombine edecek şekilde hidrojel skafoldlar çeşitlendirilecektir.

### 3. ESM Komponentler ile Yapılan Skafoldlar

Menisküsün primer fonksiyonlarının altındaki temel faktörün ESM olduğu kabul edilir. ESM komponentli skafoldlar, orijinal matriksin bolca bulunan makromolekülleri üzerinden şekillendirilmişlerdir. Örneğin, **kollajen menisküs implantları** veya **hyalüronan skafoldlar**. Bunların kombinasyonları da yapılabilir (kollajen-GAG skafoldlar veya birden fazla tipte kollajen içeren skafoldlar). **Kollajen skafoldlar**, birçok işleme metoduna uygundur; nanofiber elektrospinning, anizotropik yerleştirme ve çaprazlama (cross-linking). *Bu metodlar dolayısıyla ESM skafoldlar sentetik skafoldlara göre daha güçlü yapıdadır.* ESM skafoldlar ekilen hücreler için biyoaktiviteyle beraber **daha doğal** bir çevrede sağlarlar. Genel olarak ESM komponentli skafoldlar sentetik ve hidrojel materyalli skafoldlara göre içerik olarak **daha biyomimetik** özelliktedir (1). **HYAFF -11**: Hyalüronan içindeki glukronik asit gruplarının modifiye edilmesi ile elde edilen bir ESM komponent skafolddur.

Klinik açıdan bakıldığında ESM komponentli skafoldlar diğer tüm skafold türlerinden daha dikkat çekicidir. Nedeni de **kollajen menisküs implantlarının** kullanılıyor olmasıdır. Kollajen menisküs implantı cerrahi bir yama olarak

sığırdan elde edilen kollajen tip I ve aldehitlerle çaprazlamayla elde edilerek öncelikle lateral ve medial menisküs şekli verilir (29). Çok merkezli yapılan kollajen menisküs implant çalışmasında; menisküs restorasyonunda parsiyel menisektomiye göre kollajen menisküs implantıyla cerrahiden bir yıl sonra daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Menisküs problemleri nedeniyle kronik semptomları olan hastalarda implant sonrası yedinci yılda, aktivite skorlarında artışlar saptanmıştır (30). Ancak kollajen menisküs implantı total menisektomili hastalar için bir tedavi seçeneği değildir. Ayrıca *implant sonrası degradasyon* ve küçülmeye bağlı *şekil uyumsuzluğu* önemli bir problemdir (31). *İmplantın süürasyonundaki zorluk* kullanımını sınırlandırmaktadır. Bu asellüler skafoldun iyileşmedeki primer etkisinin, hücre migrasyonu ve menisküs matriks sentezi olduğu düşünülmektedir. Koyunlarda yapılan çalışma sonuçlarına göre kollajen menisküs implantına ekilen otolog fibrokondrositler iyileşmeyi geliştirmektedir (7). Bu çalışmada ekili implant ekili olmayana göre anlamlı derecede büyüktür. Ayrıca ekili implantın daha fazla ESM depolaması ve daha düşük selülarite gösterdiği histolojik çalışmalarla gösterilmiştir. Çalışma ekili implantlarda matriks remodellinginin arttığı sonucunu bildirmektedir. Bu çalışma itibariyle FDA 2008 yılında asellüler kollajen menisküs implantını yürürlükten kaldırmıştır. Çalışma

hücreye dayalı doku mühendisliğine yönelinmesiyle sonuçlanmıştır (1).

Genel olarak ESM komponent içeren skafoldlar birçok özelliği bünyesinde bulundurur; mekanik, bioaktivite, yapısal. Bu kategori skafold temelli doku mühendisliğinde en çok gelecek vadeden gruptur. Uygun lubrikasyon ve skafold degradasyon kinetiklerinin kontrolü için uygun ESM komponentinin tanımlanması ileri çalışmalar için fırsat alanlarıdır.

#### 4. Dokudan elde edilen skafoldlar

Doku kaynaklı skafold materyalleri işlenmiş doku (örnek ince bağırsak mukozası-İBKS), desellülarize ESM (dESM) ve ipektir. Bu tür materyallerin kullanımı ESM komponentleri ile benzer şekildedir; hücre ekimi için doğal mikro ortam oluşturmak, migrasyon ve ESM depolama amaçlanır. Bu skafoldların geometrik uygunluğu ve biyoaktiviteleri yüksek olmakla beraber doğal dokudan elde edilme zorunlulukları nedeniyle problemlidir. Çalışmalardan çıkan sonuçlarda doku büyümesi olduğu fakat biyomekanik özelliklerin ve/veya kıkırdak dejenerasyonun kötüleştiği yönündedir (32-34). Yani rejenere doku *mekanik açıdan yetersizdir*. Doku kaynaklı menisküs skafoldlarının resellülarizasyon sonrası biyolojik ve mekanik performansının geliştirilmesi ve *invivo* implantasyonu çalışılması gereken alanlardır.

#### 3. Skafold kullanılmadan dokunun kendi kendine toplanması (KKT)

Son yıllarda “Kendi Kendine Toplanma (KKT)” fonksiyonel kıkırdak, fibrokıkırdak, vaskülarite ve retina rejenerasyonu için desteklenmeye başlandı (35). Kıkırdak ve fibrokıkırdak dokusunda “Kendi Kendine Toplanma” yaklaşımı skafoldların yerini almaya başlamıştır. **KKT**, yüksek yoğunluklu hücre ekimi, hücre-hücre adezyonu, hücre – matriks adezyonu ve hücre – hücre sinyalleşmesi ve hücrelerin hızlı bir şekilde gelişerek matriks ile birleşerek ölçülebilir mekanik özellikler göstermesi temeline dayanır (35-37). Bu işlemin karakteristiği; artiküler kondrositler hücre birleşmesi sırasında yüksek miktarda N-kadherin ekspresyonu gösterir. Ardından kollajen VI perisellüler matriks sentezi ve sonunda kollajen II ve GAG ile ESM sentezi yapılır (37).

Skafold desteğine olan ihtiyacı ortadan kaldırarak doku mühendisliğine bir çok avantaj sağlamaktadır. Skafold kullanılmayan metod, biyomateryal kullanımını terk etmek manasına gelmemektedir. KKT süresince sirküler agaroz içinde şekillenmesiyle sirküferansiyal kontraktil güçler yeni dokunun anizotropisinin gelişmesine yardımcı olur (38).

#### 4. Menisküs Doku Mühendisliğinde Biyokimyasal Stimülüs Uygulamaları

MDM’de en önemli biyokimyasal stimülüs **büyüme faktörleridir**. Hepsi içinde menisküs hücre proliferasyonunda **b-FGF**’nin güçlü bir cevap oluşturduğu bilinmektedir (39). Büyüme faktörlerinin özelliklerinin incelendiği çalışmada

*menisküs hücrelerinin proliferasyonu* stimüle edilmiştir. Bunlar içinden b-FGF, PDGF-AB, EGF ve TGF- $\alpha$  proliferasyonu artırırken içlerinde en büyük etkiyi b-FGF göstermiştir (39). Bu dört büyüme faktörü ayrıca menisküs hücrelerinin *kollajen sentezini* de uyardır. *Menisküs hücre migrasyonu* üzerine olan etki incelenmiş. PDGF-AB ve HGF'nin menisküsün tüm bölgelerinden hücrelerin göçünü uyardığı gözlenmiştir (40). TGF- $\beta$  ailesinin menisküs hücrelerinin *matriks proteinlerini artırma* kabiliyeti gösterilmiştir (3,36,41). TGF-  $\beta_1$  ayrıca; *Lubrisin veya yüzeyel bölge proteinini (SZP)* artırdığı görülmüştür. Bu protein kıkırdak üzerinde *lubrikasyona* yardımcı olduğu kabul edilen proteindir. Son olarak TGF- $\beta$ 'nin menisküs hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (39). **Menisküs hücrelerinin proliferasyon/üretim fonksiyonları arasında birine doğru yönelerek o fonksiyonu yaparak diğerini terkettiği izlenmiştir.** Büyüme faktörlerinin bir diğer önemli fonksiyonu *matriks kontraksiyonunu düzenleyebilme* özelliğidir. Hem fibroblastlar (42) hem de artiküler kondrositler (43) çevrelerindeki matriks üzerinde lokal kontraktıl güç uygularlar. Çevre dokular, kontraksiyonun kontrolsüz olmasında yardımcı olurlar. Çünkü ESM'nin sıkışık yapısı ve dizilimi, anizotropik dizilime ve daha güçlü mekanik özelliklere neden olacaktır. Bir diğer konu fibroblast kontrollü kontraksiyonun inhibisyonu tendonların mekanik özelliklerinin

gelişimini engellemektedir (44). Bununla birlikte çok fazla kontraksiyon yapının uygun olmayan geometrisini açıklayacaktır (38). Kontrolsüz kontraksiyonun kıkırdak için biyofiziksel anlamı, daha fazla skar dokusu oluşumudur. TGF- $\beta_1$  ve PDGF, menisküs hücreleri, fibroblast ve artiküler kondrositler tarafından daha güçlü matriks kontraksiyonu demektir (36,45). FGF-2 ve IGF-1 ise artiküler kondrosit kontrollü kontraksiyonu artırmaktadır (46). *Menisküs hücre fenotipi*, tek tabakalı çoğaltma sırasında FGF-2 işlemiyle korunabildiği, TGF- $\beta_1$  ile yapılan işleme menisküs fibrokondrositlerinin daha kondrositik fenotipe zorlandığı görülmüştür. Kondrositler tarafından üretilen meniskal fibrokıkırdak farklı bölgeler içeren bir dokudur. Bazı bölgelerde hyalin artiküler kıkırdağa benzer bazı bölgelerde ise benzemez. Bu çeşitli sonuçlar göstermektedir ki hücrelerin gösterdiği potansiyel nedeniyle gelecek çalışmalar *fibrokıkırdak farklılaşması* üzerine olacaktır. *Kondroitinaz ABC (C-ABC)* bir diğer biyokimyasal stimulandır. Bu enzim proteoglikanların neden olduğu artmış basınç ile kollajen ağının neden olduğu gerilme kuvveti arasında dinamik bir denge sağlar (47). Kıkırdak GAG içeriğinin enzimi tüketimi, dokunun tensil özelliğini artırır (36,48). Gerçekten de serum serbest C-ABC tedavisi (self-assembled ve agaroz skafold içinde) ile tedavisi kontrol grubuna göre artmış tensil özellik gösterir. KKT menisküs yapılarında (menisküs hücreleri ve artiküler kondrositlerden oluşan) C-ABC tedavisi



ile yaklaşık 2-3 kat artmış tensil modulus saptanmıştır (36).

Gelecek çalışmalar, konvansiyonel olmayan büyüme faktörleri (mesela serum kaynaklı fosfolipid ajan lizofosfatidik asit (LPA) ) üzerine yoğunlaşabilir. Anti apoptotik özelliği geniş olarak çalışılmıştır. PRP (platelet rich plasma) kaynaklı olan faktörler olabilir. PRP'nin matriks depolanması ve monolayer ortamda menisküs hücre proliferasyonunu artırdığı gösterilmiştir (49). Fibrokırdak dokunun biyokimyasal stimulus yolu ile oluşturulması yeni çalışılmaya başlanan bir tekniktir ve geliştirilmeye açıktır.

### 5. Menisküs Doku Mühendisliğinde Mekanik Stimulasyon Uygulamaları

Menisküs hücreleri mekanik stimulusa ya pozitif yanıt vererek fibrokırdak ESM yapımını artırır veya negatif şekilde matriks çözücü ve inflamatuvar faktörlerin salınımına neden olur. Menisküs dokusunu uyarmak üzere birçok farklı metod bulunmaktadır. Bunlar içinde yüksek ve alçak makaslama sıvı perfüzyonu, hidrostatik basınç, direk kompresyon ve ultrasound bulunur. Eksplant ve sentetik doku uygulamaları **hidrostatik basınca cevap** olarak farklı remodeling şekilleri göstermiştir. Mesela; tavşan menisküs eksplantları siklik hidrostatik basınca maruz bırakılmışlardır. Sonucunda *inflamatuvar faktörler ve matriks çözünen proteinlerin miktarı artmıştır* (50). Bu yapılarda kollagen ve GAG içeriği ve *kompresif özellikler* kontrol grubu ve dinamik hidrostatik rejimlere göre *anlamlı olarak*

*yüksek* bulunmuştur (51). Ayrıca PLLA skafolda ekili tavşan menisküs hücrelerine hidrostatik basınç ile stimülasyona ek olarak TGF- $\beta_1$  kombine edilmiş. Kollajen ve GAG içeriklerinde ekstra artış ve kompresif güçte sinerjistik artış elde edilmiştir (52). **Direk kompresif stimülasyon** incelenmiş yetersiz veya fazla yüklenmenin olumsuz sonuçları olduğu gözlenmiştir. Mesela: statik ve dinamik yüklenme rejimleri uygulanmış; Tip I, tip II Kollajen ve dekorin mRNA seviyelerinde düşme, matriks çözücü metalloproteinaz-1 (MMP-1) ve kollajenaz mRNA seviyelerinde artış meydana gelmiştir (53). Domuz menisküs eksplantları üzerine uygulanan dinamik kompresyon nitrik oksit üretimini artırmıştır. *Nitrik oksit; artrit ve menisküs dejenerasyonunu gösteren potent sinyal molekülüdür* (54). Sonuç olarak *tam doğru yüklenme olmadığından matriks ve doku çözünmesine neden olmaktadır*.

Biyolojik menisküs yüklenmesi *invivo* 1000 Newton kadardır (55). Bu yüklenmenin avasküler menisküs bölgesine besin geçisini uyardığı kabul edilir. Ayrıca menisküs hücreleri üzerine tensil yüklenmenin inflamatuvar faktörlerin üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir (56). Makaslama genel olarak kondrosit fenotip üzerine zararlı kabul edilirken, ossilatuar sıvı akımının menisküs hücrelerinin kalsiyum sinyalini ve GAG üretimini artırdığı gösterilmiştir (57). MDM'de uygulanan tüm yöntemler içinde mekanik stimülasyon, değişkenlerin çokluğu (metod,

uygulama zamanı, büyüklüğü, süresi, stimülasyon frekansı ) nedeniyle belki de en belirsiz ve geniş fırsatlar içeren daldır.

## 6. Gen Tedavisi

Gen terapisi MDM'de alternatif rejeneratif stratejiler arasında kabul edilmeye başlanmıştır. Viral veya nonviral vektörler veya direk gen transferi yoluyla uygulanmaktadır. Gen transferi iyileşmeyi uyarıcı faktörlerin yaralanma alanında kodlanarak çalışması prensibine dayanır. Genellikle menisküs lezyonlarında adeno virüs, adeno ilişkili virüs ve retro virüs kullanılır. Viral vektörler, ölü hücreler içine genlerin girişini sağlayarak büyüme faktörlerinin salınmasına neden olurlar (58). Bu yolla yapılan çalışmada retrovirüs aracılı TGF- $\beta$ 1 *tek tabakalı kültüre edilen insan ve köpek hücrelerine infekte edilmiş, kollajen ve proteoglikan sentezinde anlamlı artış saptanmıştır* (59). Diğer bir çalışmada hücre ekili sığır PGA skafolduna Hepatosit büyüme faktör geni (AdHGF) kodlu adeovirus infekte edilmiş. 2 hafta içinde vaskülarize fibröz doku, 8 hafta içinde menisküs benzeri vaskülarize doku oluştuğu izlenmiştir (60). Yazarlar gen transferi tekniğiyle menisküs örneklerinde kan damarı gelişiminin uyarılabileceği sonucuna varmışlardır.

## Sonuç ve Gelecek beklentileri

Bu parça, MDM açısından günümüz konseptlerine genel bir bakış sağlamaktadır. Genel popülasyon içerisinde çeşitli yaş grupları arasında menisküs lezyonlarının sıklığı, mevcut

onarım tekniklerinin yetersizliği ve bunlara sekonder olarak eklem kıkırdağındaki dejeneratif değişiklikler osteortrit ile ilerleyerek dünya çapında dikkate değer sosyoekonomik maliyete neden olmaktadır. Bu nedenlerden etkili tedavi modalitelerinin MDM temelinde araştırılmasına ihtiyaç vardır. Doku mühendisliğinin amacı, hasta dokusunun yerini tutacak veya onunla bütünleşerek mekanik fonksiyonları restore edecek yapılar meydana getirmektir. Mevcut tedavi stratejileri birçok önemli dizayn prensipleri ortaya konmuştur. *İlk önce* orijinal menisküs dokusundaki hücrelere benzer fenotipte olan hücreleri içeren doku ihtiyacı olup bu ihtiyacı fibrosit ve kondrosit benzeri hücrelerin varlığı ile ortaya konmuştur. *İkinci olarak*, menisküsün biyokimyasal içeriği (kollajen, GAG) bölgesel farklılık gösteren orijinal menisküse benzer olmalıdır. *Üçüncü olarak*, fonksiyonel anizotropi menisküs mühendisliğinde bir diğer temel prensiptir. Mekanik özellikleri sağlayan fonksiyonel anizotropi uygun ESM içeriğinin taklit edilmesi ile mümkün olacaktır. Tüm bu prensiplerin incelenmesi ile doku mühendisleri tamamıyla fonksiyonel menisküs oluşturabilecektir.

Deneysel çalışmaların ilerletilmesi ve iyi dizayn edilmiş prospektif, randomize, kontrollü klinik çalışmalarla uzun dönem kantitatif ölçütlerin belirlenerek *invivo* değerlendirmelerinin yapılması çalışma alanlarıdır. Endikasyon ve kontrendikasyonların belirlenmesi, uygun hasta

seleksiyonu ve özelleşmiş cerrahi tekniklerde karar kılınması gerekli diğer hususlardır.

#### KAYNAKLAR

1. Makris EA, Hadidi P, Athanasiou KA. The knee meniscus: structure-function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration. *Biomaterials*. 2011;32(30):7411-31
2. Marsano A, Vunjak-Novakovic G, Martin I. Towards tissue engineering of meniscus substitutes: selection of cell source and culture environment. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2006;1:3656-8.
3. Collier S, Ghosh P. Effects of transforming growth factor beta on proteoglycan synthesis by cell and explant cultures derived from the knee joint meniscus. *Osteoarthritis Cartilage*. 1995;3:127-38.
4. Gunja NJ, Athanasiou KA. Passage and reversal effects on gene expression of bovine meniscal fibrochondrocytes. *Arthritis Res Ther*. 2007;9:R93.
5. Peretti GM, Gill TJ, Xu JW, Randolph MA, Morse KR, Zaleske DJ. Cell-based therapy for meniscal repair: a large animal study. *Am J Sports Med*. 2004;32:146-58.
6. Weinand C, Peretti GM, Adams SB Jr, Randolph MA, Savvidis E, Gill TJ. Healing potential of transplanted allogeneic chondrocytes of three different sources in lesions of the avascular zone of the meniscus: a pilot study. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2006;126:599-605.
7. Ramallal M, Maneiro E, Lopez E, Fuentes-Boquete I, Lopez-Armada MJ, Fernandez-Sueiro JL. Xenotransplantation of pig chondrocytes into rabbit to treat localized articular cartilage defects: an animal model. *Wound Repair Regen*. 2004;12:337-45.
8. Hoben GM, Koay EJ, Athanasiou KA. Fibrochondrogenesis in two embryonic stem cell lines: effects of differentiation timelines. *Stem Cells*. 2008;26:422-30.
9. Hoben GM, Willard VP, Athanasiou KA. Fibrochondrogenesis of hESCs: growth factor combinations and cocultures. *Stem Cells Dev*. 2009;18:283-92.
10. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*. 2001;98:2396-402.
11. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol*. 2007;213:341-7.
12. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 2006;98:1076-84.
13. Nerurkar NL, Sen S, Baker BM, Elliott DM, Mauck RL. Dynamic culture enhances stem cell infiltration and modulates extracellular matrix production on aligned electrospun nanofibrous scaffolds. *Acta Biomater*. 2011;7:485-91.
14. Kopf S, Birkenfeld F, Becker R, Petersen W, Starke C, Wruck CJ. Local treatment of meniscal lesions with vascular endothelial growth factor. *J Bone Jt Surg Am*. 2010;92:2682-91.
15. Zhang ZN, Tu KY, Xu YK, Zhang WM, Liu ZT, Ou SH. Treatment of longitudinal injuries in avascular area of meniscus in dogs by trephination. *Arthroscopy*. 1988;4:151-9.
16. Uchio Y, Ochi M, Adachi N, Kawasaki K, Iwasa J. Results of rasping of meniscal tears with and without anterior cruciate ligament injury as evaluated by second-look arthroscopy. *Arthroscopy*. 2003;19:463-9.
17. Gershuni DH, Skyhar MJ, Danzig LA, Camp J, Hargens AR, Akeson WH. Experimental models to promote healing of tears in the avascular segment of canine knee menisci. *J Bone Jt Surg Am*. 1989;71:1363-70.
18. Yamazaki K, Tachibana Y. Vascularized synovial flap promoting regeneration of the cryopreserved meniscal allograft: experimental study in rabbits. *J Orthop Sci*. 2003;8:62-8.
19. Izuta Y, Ochi M, Adachi N, Deie M, Yamasaki T, Shinomiya R. Meniscal repair using bone marrow-derived mesenchymal stem cells: experimental study using green fluorescent protein transgenic rats. *Knee*. 2005;12:217-23.
20. Pabbruwe MB, Kafienah W, Tarlton JF, Mistry S, Fox DJ, Hollander AP. Repair of meniscal cartilage white zone tears using a stem cell/collagen-scaffold implant. *Biomaterials*. 2010;31:2583-91.
21. Shi S, Gronthos S, Chen S, Reddi A, Counter CM, Robey PG. Bone formation by human postnatal bone marrow stromal stem cells is enhanced by telomerase expression. *Nat Biotechnol*. 2002;20:587-91.
22. Yu H, Adesida AB, Jomha NM. Meniscus repair using mesenchymal stem cells – a comprehensive review. *Stem Cell Research & Therapy* 2015;6:86
23. Haut Donahue TL, Hull ML, Rashid MM, Jacobs CR. The sensitivity of tibiofemoral contact pressure to the size and shape of the lateral and medial menisci. *J Orthop Res*. 2004;22:807-14.
24. Cohen DL, Malone E, Lipson H, Bonassar LJ. Direct freeform fabrication of seeded hydrogels in arbitrary geometries. *Tissue Eng*. 2006;12:1325-35.
25. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Dave AM, Kumbhar SG, Rudzinski WE. Stimulus-responsive “smart” hydrogels as novel drug delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm*. 2002;28:957-74.
26. Liu Tsang V, Chen AA, Cho LM, Jadin KD, Sah RL, DeLong S. Fabrication of 3D hepatic tissues by

- additive photopatterning of cellular hydrogels. *FASEB J.* 2007;21:790–801.
27. Richter C, Reinhardt M, Giselbrecht S, Leisen D, Trouillet V, Truckenmuller R. Spatially controlled cell adhesion on three-dimensional substrates. *Biomed Microdevices.* 2010;12:787–95.
  28. Chen JP, Cheng TH. Thermo-responsive chitosan-graft-poly (N-isopropylacrylamide) injectable hydrogel for cultivation of chondrocytes and meniscus cells. *Macromol Biosci.* 2006;6:1026–39.
  29. Stone KR, Steadman JR, Rodkey WG, Li ST. Regeneration of meniscal cartilage with use of a collagen scaffold. Analysis of preliminary data. *J Bone Jt Surg Am.* 1997;79:1770–7.
  30. Rodkey WG, DeHaven KE, Montgomery WH 3rd, Baker CL Jr, Beck CL Jr, Hormel SE. Comparison of the collagen meniscus implant with partial meniscectomy. A prospective randomized trial. *J Bone Jt Surg Am.* 2008;90:1413–26.
  31. Schoenfeld AJ, Landis WJ, Kay DB. Tissue-engineered meniscal constructs. *Am J Orthop (Belle Mead NJ).* 2007; 36:614–20.
  32. Cook JL, Tomlinson JL, Kreeger JM, Cook CR. Induction of meniscal regeneration in dogs using a novel biomaterial. *Am J Sports Med.* 1999;27:658–65.
  33. Cook JL, Fox DB, Malaviya P, Tomlinson JL, Kuroki K, Cook CR. Long-term outcome for large meniscal defects treated with small intestinal submucosa in a dog model. *Am J Sports Med.* 2006;34:32–42.
  34. Bradley MP, Fadale PD, Hulstyn MJ, Muirhead WR, Lifrak JT. Porcine small intestine submucosa for repair of goat meniscal defects. *Orthopedics.* 2007;30:650–6.
  35. Hu JC, Athanasiou KA. A self-assembling process in articular cartilage tissue engineering. *Tissue Eng.* 2006;12:969–79.
  36. Huey DJ, Athanasiou KA. Maturation growth of self-assembled, functional menisci as a result of TGF-beta1 and enzymatic chondroitinase-ABC stimulation. *Biomaterials.* 2011;32:2052–8.
  37. Ofek G, Revell CM, Hu JC, Allison DD, Grande-Allen KJ, Athanasiou KA. Matrix development in self-assembly of articular cartilage. *PLoS One.* 2008;3:e2795.
  38. Aufderheide AC, Athanasiou KA. Assessment of a bovine co-culture, scaffold-free method for growing meniscus-shaped constructs. *Tissue Eng.* 2007;13:2195–205.
  39. Kasemkijwattana C, Menetrey J, Goto H, Niyibizi C, Fu FH, Huard J. The use of growth factors, gene therapy and tissue engineering to improve meniscal healing. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2000;13:19–28.
  40. Bhargava MM, Attia ET, Murrell GA, Dolan MM, Warren RF, Hannafin JA. The effect of cytokines on the proliferation and migration of bovine meniscal cells. *Am J Sports Med.* 1999;27:636–43.
  41. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res.* 1998;238:265–72.
  42. Freyman TM, Yannas IV, Yokoo R, Gibson LJ. Fibroblast contraction of a collagen-GAG matrix. *Biomaterials.* 2001;22:2883–91.
  43. Zaleskas JM, Kinner B, Freyman TM, Yannas IV, Gibson LJ, Spector M. Contractile forces generated by articular chondrocytes in collagen-glycosaminoglycan matrices. *Biomaterials.* 2004;25:1299–308.
  44. Kalson NS, Holmes DF, Kapacee Z, Otermin I, Lu Y, Ennos RA. An experimental model for studying the biomechanics of embryonic tendon: Evidence that the development of mechanical properties depends on the actinomyosin machinery. *Matrix Biol.* 2010;29:678–89.
  45. Rhee S, Grinnell F. P21-activated kinase 1: convergence point in PDGF- and LPA-stimulated collagen matrix contraction by human fibroblasts. *J Cell Biol.* 2006;172:423–32.
  46. Veilleux N, Spector M. Effects of FGF-2 and IGF-1 on adult canine articular chondrocytes in type II collagen-glycosaminoglycan scaffolds in vitro. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005;13:278–86.
  47. Asanbaeva A, Masuda K, Thonar EJ, Klisch SM, Sah RL. Mechanisms of cartilage growth: modulation of balance between proteoglycan and collagen in vitro using chondroitinase ABC. *Arthritis Rheum.* 2007;56:188–98.
  48. Natoli RM, Revell CM, Athanasiou KA. Chondroitinase ABC treatment results in greater tensile properties of self-assembled tissue-engineered articular cartilage. *Tissue Eng Part A.* 2009;15:3119–28.
  49. Ishida K, Kuroda R, Miwa M, Tabata Y, Hokugo A, Kawamoto T. The regenerative effects of platelet-rich plasma on meniscal cells in vitro and its in vivo application with biodegradable gelatin hydrogel. *Tissue Eng.* 2007;13:1103–12.
  50. Natsu-Ume T, Majima T, Reno C, Shrive NG, Frank CB, Hart DA. Menisci of the rabbit knee require mechanical loading to maintain homeostasis: cyclic hydrostatic compression in vitro prevents derepression of catabolic genes. *J Orthop Sci.* 2005;10:396–405.
  51. Gunja NJ, Athanasiou KA. Effects of hydrostatic pressure on leporine meniscus cell-seeded PLLA scaffolds. *J Biomed Mater Res A.* 2010;92:896–905.
  52. Gunja NJ, Uthamanthil RK, Athanasiou KA. Effects of TGF-beta1 and hydrostatic pressure on meniscus cell-seeded scaffolds. *Biomaterials.* 2009;30:565–73.
  53. Upton ML, Chen J, Guilak F, Setton LA. Differential effects of static and dynamic compression on meniscal cell gene expression. *J Orthop Res.* 2003;21:963–9.
  54. Fink C, Fermor B, Weinberg JB, Pisetsky DS, Misukonis MA, Guilak F. The effect of dynamic mechanical compression on nitric oxide production in the meniscus. *Osteoarthritis Cartilage.* 2001;9:481–7.
  55. Fukubayashi T, Kurosawa H. The contact area and pressure distribution pattern of the knee. A study of

- normal and osteoarthrotic knee joints. *Acta Orthop Scand.* 1980;51:871–9.
56. Ferretti M, Madhavan S, Deschner J, Rath-Deschner B, Wypasek E, Agarwal S. Dynamic biophysical strain modulates proinflammatory gene induction in meniscal fibrochondrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;290:C1610–5.
57. Eifler RL, Blough ER, Dehlin JM, Haut Donahue TL. Oscillatory fluid flow regulates glycosaminoglycan production via an intracellular calcium pathway in meniscal cells. *J Orthop Res.* 2006;24:375–84.
58. Longo UG, Campi S, Romeo G, Spiezia F, Maffulli N, Denaro V. Biological strategies to enhance healing of the avascular area of the meniscus. *Stem Cells Int.* 2012;2012:528359.
59. H.Goto, F.D. Shuler, C.Niyibizi, F.H. Fu, P.D. Robbins, C. H. Evans. Gene therapy for meniscal injury: enhanced synthesis of proteoglycan and collagen by meniscal cells transduced with a TGF $\beta$ 1 gene. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2000;8:266-71.
60. C. Hidaka, C. Ibarra, J. A. Hannafin. Formation of vascularized meniscal tissue by combining gene therapy with tissue engineering. *Tissue Engineering.* 2002;8:93-105.