

Enjektabil kondrosit*

Cemil Yıldız⁽¹⁾, Muhterem Bahçe, ⁽²⁾ Ali Şehirlioğlu, ⁽³⁾ Servet Tunay⁽³⁾, Kaan Erler⁽³⁾, Mustafa Başbozkurt⁽⁴⁾, Gönül Oğur⁽⁵⁾, Ethem Gür⁽⁶⁾

Bir çok insanı etkileyen eklem hasarındaki temel sorun, yüksek oranda diferansiye olmuş, vasküler kan desteği eksik ve yalnızca sınırlı rejenerasyon kabiliyetine sahip olan erişkin eklem kıkırdağıdır. Femorotibial eklem yüzeyindeki osteokondral defektlerin tamirinde son zamanlarda ilginin arttığı çok ümit verici bir yöntem ise otolog kondrosit transplantasyonudur. Hastanın kendisinden izole edilmiş hücreler, invitro olarak çoğaltılabilmekte ve elde edilen kültüre otolog kondrositler, hastanın hasarlanmış kıkırdağının tamiri için tekrar defektli bölgeye transplante edilmektedir. Biz bu çalışmamızda insan diz eklemi hiyalin kıkırdağından aldığımız doku örneklerinden izole ettiğimiz kondrositleri, monolayer kültür sistemi kullanarak çoğalttıktan sonra iki ayrı yöntem kullanarak (tripsinizasyon ve kazıma) otolog kondrosit transplantasyonunda kullanılacak enjektabil forma getirdik.

Anahtar kelimeler: Monolayer kültür, enjektabil kondrosit, kondrosit transplantasyonu

Injectable Chondrocyte

Joint cartilage injury which affects many children and adults, involves the highly differentiated mature joint cartilage characterized by the lack of a vascular blood supply and little regeneration capacity. A newly developed method in the repair of osteochondral injuries on the femoro-tibial joint surface is autologous chondrocyte transplantation. Cells isolated from the patient can be proliferated in vitro and these cultured autologous chondrocytes can be transplanted into the defect site for the repair of the injured cartilage. In this study, we isolated the chondrocytes taken from tissue samples of human knee joint hyalin cartilage, proliferated those chondrocytes by using two different methods; a) tripsinization, b) scraping, and turned them into the injectable forms that can be used in autologous chondrocyte transplantation.

Keywords: Monolayer culture, injectable chondrocyte, chondrocyte transplantation

Sinovyal eklemlerdeki görüntüleme yöntemleri ve artroskopik tekniklerdeki ilerlemeler kondral ve ostokondral defektlerin tiplerinin ve sıklığının saptanmasını kolaylaştırmıştır. Bu sayede ortopedik cerrahlar büyük bir doğrulukla lezyonların tanısını ve değerlendirmesini yapabilmektedir (10). Eklem kıkırdak hasarı milyonlarca insanın eklemlerini etkileyen yaygın bir problemdir (1, 4, 6, 12). Burada temel sorun yüksek oranda diferansiye olmuş, vasküler kan desteği eksik ve yalnızca sınırlı rejenerasyon kabiliyetine sahip olan erişkin eklem kıkırdağıdır (1, 4, 16). Subkondral kemiğe penetre olmayan eklem kıkırdak yaralanmaları iyileşemez ve eklem kıkırdağının dejenerasyonuna yol açacak şekilde ilerler (1, 6).

Eklem kıkırdak hasarı sonucu meydana gelen ağrı ve yetersizlik (fonksiyon kaybı), kıkırdak tamirini kolaylaştıracak ve arttıracak yolların araştırılmasını başlatmıştır (1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 17). Tamir veya rejenerasyon olan kıkırdağın, eklem dokusu olarak tatmin edici bir performans göstermesi için, sinovyal eklem normal ağrısız hareketi yeniden sağlanmalıdır. Bunun oluşması için de tamir dokusunun yapısı, kompozisyonu, mekanik özellikleri ve sağlamlılığı doğal eklem yüzeyine benzer bir şekilde olmalıdır

(1, 4).

Eklem kıkırdağı üzerindeki yeni araştırmalar, eklem kıkırdağının biyolojisi, kompozisyonu, metabolizması ve biyomekanik özelliklerinin anlaşılması ile ilgili son ilerlemeler ışığında, eklem yaralanmalarında ve dejeneratif eklem hastalıklarının tedavisinde prostetik eklem replasmanlarına alternatif olarak biyolojik temelli prosedürlerin gelişimi için umut vermektedir (1, 2, 3, 4, 18).

Femorotibial eklem yüzeyindeki osteokondral defektlerin tamirinde son zamanlarda ilginin arttığı çok ümit verici bir yöntem ise otolog kondrosit transplantasyonudur. Hastanın kendisinden izole edilmiş hücreler, invitro olarak çoğaltılabilmekte ve elde edilen kültüre otolog kondrositler, hastanın hasarlanmış kıkırdağının tamiri için tekrar defektli bölgeye transplante edilmektedir (2, 3, 9, 13, 14, 19).

Biz çalışmamızda insan diz eklemi hiyalin kıkırdağından aldığımız doku örneklerinden izole ettiğimiz kondrositleri monolayer kültür sistemi kullanarak çoğalttıktan sonra otolog kondrosit transplantasyonunda kullanılacak enjektabil forma getirmeyi amaçladık.

(1) GATA Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Araştırma Görevlisi

(2) GATA Tıbbi Genetik Bilim Dalı, Doktora

(3) GATA Ortopedi ve Travmatoloji Ana Bilim Dalı, Yrd. Doç. Dr

(4) GATA Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Prof. Dr

(5) GATA Tıbbi Genetik Bilim Dalı Başkanı, Doç. Dr

(6) GATA Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı Başkanı, Prof. Dr

* Bu çalışma GATA Araştırma ve Geliştirme Merkezi (AR-96/38) tarafından desteklenmektedir.

Gereç ve yöntem

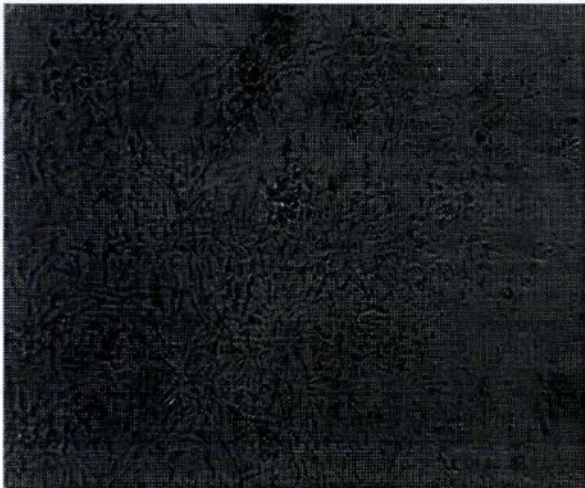
Bu çalışma Kasım 1996 ve Nisan 1997 tarihleri arasında Gülhane Askeri Tıp Akademisi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı (ABD) ile Tıbbi Genetik Bilim Dalı'nın ortaklaşa yürüttüğü proje çerçevesinde yapılmıştır. Çalışmadaki total diz protezi uygulanan 20 hastadan elde edilen 500 mg'lık kıkırdak doku örnekleri kullanılmıştır.

Hastaların yaşları 55 ile 68 arasında (ortalama yaş: 60.4) değişmekteydi. Cerrahi işlem sırasında, steril koşullar altında, hastalardan normal eklem kıkırdak dokusu alındı. Alınan materyal derhal transport mediumuna (taşıma solüsyonu) konuldu. Transport mediumu olarak 10cc RPMI 1640 (Sigma, USA) kullanıldı. örnekler üç kez PBS (fosfat buffered solution) ile yıkandı ve 37°'deki %5 CO₂'lik inkübatörde (kısa sürelerde) veya +4°'de buzdolabı içinde (uzun sürelerde) saklandı (11). Çalışma yapılacağı zaman materyaller laminar hava akımlı kabin (Sistem Teknik, Türkiye) içinde taşıma solüsyonundan alınarak 35mm'lik petri kabına konuldu ve 15 numaralı bistüri ile 0.5mm'den ufak olacak şekilde parçalara ayrıldı.

Kıkırdak doku örnekleri üzerine son konsantrasyonu 1mg/ml olacak şekilde Tip II kollajenaz (Biochrom, Almanya) ve kültür mediumu (Tablo 1) eklenerek 35mm'lik petri kaplarına konuldu. 37°'de %5 CO₂ ve %90 nemi olan inkübatör (Sanyo IR, Japonya) içinde manyetik karıştırıcı olmaksızın 12 saat süreyle inkübe edildi. Sonra örnekler invert ışık mikroskopunda (Zeiss, Almanya) kontrol edilerek, süspansiyon haline geldiği gözlenen hücreler pipetle

RPMI-1640 veya DMEM (Sigma)	100 ml
L-Glutamim (Seromed) 200 mM	1.5 ml
Penisilin - Streptomisin (Seromed) 10000 U/10mg	1 ml
Fetal Kalf Serum (Seromed)	20 ml

Tablo 1: Kültüre kondrositlerin beslenmesinde kullanılan kültür mediumunun içeriği



Şekil 1: Monolayer sistemde hücrelerin invert ışık mikroskop (Zeiss) görüntüsü, (X10)

alındı ve santrifüj tüpüne konuldu. Üzerine 5ml kültür mediumu daha eklenerek 1000 rpm.de 10dk santrifüj edildi (Heraus, Labofuge 200, Almanya).

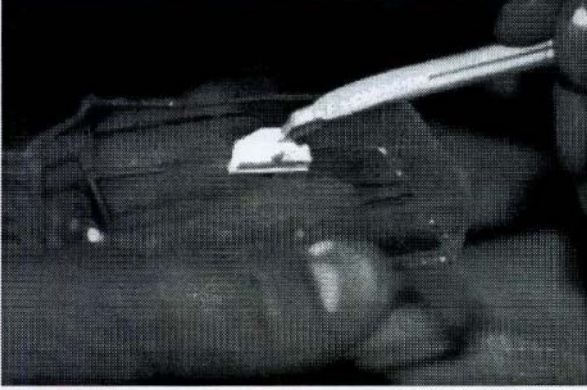
Elde edilen hücre süspansiyonlarından 20µl'lik örnek alınarak Tripkan mavisi (Sigma, USA) ile viabilite (canlılık) testi yapıldı ve canlı hücreler sayıldı. Hücrelerin sayısı 2 milyondan az ise içinde 3ml kültür mediumu içeren 25cm²'lik doku kültürü flasklarına (Falcon, USA) konuldu. Eğer 2 milyondan fazla ise 10cc kültür medium içeren 75cm²'lik doku kültürü flasklarına (Falcon, USA) konuldu. 24 saat sonra flasklar invert ışık mikroskopunda incelendiğinde her iki grupta da flaskların zeminine kondrositlerin yapıştığı gözlemlendi. Dört veya beşinci günlerde flaskın zeminine yapışmayan hücreler ve medium atılarak taze mediumla değiştirildi. Daha sonra haftada iki kez olmak üzere düzenli bir şekilde flask içindeki mediumun tamamı değiştirilerek kondrositler beslendi. İlk hücre sayısına bağlı olarak 7-10. günlerde tüm flask zemininin kondrositlerle kaplandığı izlendi (Şekil 1).

Transplante edilecek enjektabil kondrositleri elde etmek için iki yöntem kullanıldı. Birincisinde, tripsinizasyon işlemi uygulandı. Bu işlemde önce 2 ml Tripsin / EDTA (0.25/0.02) (Sigma, USA) solüsyonu flaskın içine konuldu. Sonra inkübatörde 37°'de 5 dakika süreyle inkübe edildi. İvert ışık mikroskopunda hücrelerin flask tabanından kalktığı gözlemlendikten sonra hücre süspansiyonu santrifüj tüpüne alınarak 1000 rpm'de 10 dakika santrifüje edildi. Tüpün üzerindeki sıvı kısım atıldıktan sonra üzerine 2ml kültür mediumu eklenerek dikkatli bir şekilde cam pipetle homojenize edildi. Daha sonra bu işlem üç kere tekrar edildi. Son santrifüj işleminden sonra hücre süspansiyonu 5 ml'lik enjektör içine aspire edilerek enjektabil hale getirildi.

İkinci yöntemde ise kültür flaskları inkübatörden alınarak laminar hava akımlı kabin içine konuldu. Daha sonra GATA Ortopedi ve Travmatoloji ABD Ortez ve Protez atölyesinde üretilen elektrikli kesici



Şekil 2: GATA Ortopedi ve Travmatoloji AD Ortez Protez atölyesinde üretilen elektrikli kesici ile plastik kültür flaskının üst kısmı kesildi



Şekil 3: Cell scraper (Costar, USA) ile kondrosit ve matriks yapının toplanması

ile plastik kültür flasksının üst kısmı kesildi (Şekil 2). Bu sırada flasksın kapağının açık olmasına dikkat edildi. Üst kapak tamamen çıkartıldıktan sonra "cell scraper" (Costar, USA) ile flasks tabanına yapışmış olan kondrositler kazınarak jöle kıvamında olacak şekilde toplandı (Şekil 3). Daha sonra pipet yardımıyla aspire edilerek flasksın içinden uzaklaştırıldı ve 5 ml'lik enjektör içinde enjektabl hale getirildi (Şekil 4).

Matriks sentezi (proteoglikan ve kollajen), tripsinizasyon sonrası elde edilen süspansiyondan hazırlanan sitosantrifüj kesitlerinin toludin mavisi ile boyanmasıyla ortaya konuldu. Hücrelerde tüm kültür periodu boyunca metakromatik teritoryal matriks izlendi

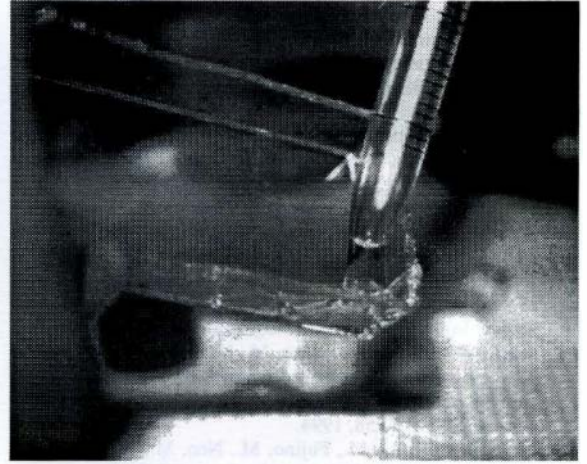
Tartışma ve sonuç

Son yıllarda doku kültürlerindeki hücrelerin büyüme ve diferansiasyonunu sağlayan çevre koşulları hakkında bilgilerimizin artması, kondrositlerin ve mezansimal hücrelerin implantasyonu yoluyla kırıkdam tamirinin indüklenmesi ile ilgili çalışmaları artırmıştır (2, 3). Fakat donör alanların sınırlı olması, alınan biopsi örneklerinden elde edilen kondrositlerin en hızlı bir şekilde proliferasyonunun sağlanması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır (1, 4, 19).

Bu çalışmamızda insan diz eklemi kırıkdağından aldığımız örneklerden enzimatik dijesyon ile izole ettiğimiz kondrositleri monolayer kültür kullanarak çoğalttık ve randomize olarak oluşturduğumuz iki ayrı grupta, iki farklı yöntem kullanarak transplantasyonda kullanılacak enjektabl formdaki kondrositleri elde ettik. Monolayer kültür sistemini kullanmamızın nedenleri; kurulmasının daha kolay olması, hücre sayısı az da olsa kültür işleminin kolay bir şekilde yapılabilmesi, hücrelerin kolay bir şekilde etrafa yayılabilmesi ve çoğaltılabilmesidir (10, 19).

Ayrıca monolayer kültürlerde elde edilen hücre dansitesi üç boyutlu kültür sistemlerine göre daha fazladır. Bu da kondrosit transplantasyonunda bir avantaj oluşturmaktadır (2, 3, 9).

Transplante edilecek kondrositlerin hazırlanmasında iki farklı yöntem kullanıldı. Bir çok çalışmada



Şekil 4: Kondrositlerin enjektabl forma getirilmesi

da kullanılan (2, 3, 15) birinci yöntemde tripsinizasyon işlemiyle enjektabl formdaki kondrositler elde edildi. Bu işlemde dikkat edilmesi gereken nokta süredir. Eğer bu işlem uzarsa kondrositler ölecek ve transplante edilecek miktar azalacaktır. Bu grupta yalnızca bir örnekte enfeksiyon gözlemlendi. İkinci yöntemde hücreler cellscrape kullanılarak flasks zemininden toplandı. Bu grupta iki olguda enfeksiyon gözlemlendi. Burada dikkatimizi çeken bir nokta, elde edilen kondrosit süspansiyonunun daha yoğun ve jöle kıvamında olmasıdır. Ayrıca hücreler arası bağlantılar koparılmadığından enjektabl haldeki kondrositler kolaylıkla bir penset yardımıyla tutulup kaldırılabilir. Bu gözlemlerimiz bize osteokondral defektlerin tamirinde bu yöntemle elde edilecek kondrositlerin daha başarılı olabileceğini düşündürmektedir. Bunların belirlenmesi için daha ileri çalışmalara gereksinim vardır.

Kaynaklar

1. Athanasiou, K.: Cartilage repair: A Viable option or an elusive problem? *Orthopaedic Tissue Engineering Congress Book*, August 1997.
2. Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O., and Peterson, L.: Treatment of Deep Cartilage Defects in the Knee with Autologous Chondrocyte Transplantation, *New Eng J. Med.*, 331:889-895, 1994.
3. Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O., and Peterson, L.: Rabbit Articular Cartilage Defects Treated With Autologous Cultured Chondrocytes. *Clin Orthop* 326:270-283, 1996.
4. Buckwalter, J. A., and Mankin, H. J.: Articular Cartilage. Part II: Degeneration and Osteoarthritis, Repair, Regeneration, and Transplantation, *J Bone Joint Surg* 79 (A): 612-627, 1997.
5. Buckwalter, J. A., and Mankin, H. J.: Articular Cartilage. Part I: Tissue Design and Chondrocyte-matrix Interactions, *J Bone Joint Surg* 79 (A): 600-608, 1997.
6. Buckwalter, J. A., and Mow, V. C.: Cartilage Repair in Osteoarthritis. *Osteoarthritis, Diagnosis, and Medical/Surgical Management*, ikinci baskı., R. W. Moskowitz, D. S. Howell, V. M. Goldberg, and H. J. Mankin (ed), W. B. Saunders, Philadelphia, 71-107, 1992..
7. Cao, Y., Ibarra, C., Vacanti, CA.: Tissue Engineering Cartilage and Bone. *Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds*. Brikhauser, Boston, 200-214, 1997.

8. Freed, L. E., Grande, D. A., Lingbin, Z., Emmanuel, J., Marquis, J. C., and Langer, R.: Joint Resurfacing Using Allograft Chondrocytes and Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds, *J Biomed Mater* 28:891-899, 1994.
9. Freshney, R. I.: *Culture of Animal Cells*, third edition, John Wiley & Sons Inc. Publication, USA, 1994.
10. Gür, E., Baydar, M.L., Aydoğan, N.: Arthroscopic Surgery of the Knee. *Acta Orthop Traumatol Turc* 25: 291-293, 1991.
11. Kim, W., Mooney, D., Vacanti, JP Upton, J., Ibarra, C., Vacanti, CA: Functional viability of chondrocytes stored at 4 C. *Tissue engineering*. 2:75-81, 1996.
12. Mankin, H. J.: The Response of Articular Cartilage to Mechanical Injury, *J Bone Joint Surg* 64 (A):460-466, 1982.
13. Noguchi, T., Oka, M., Fujino, M., Neo, M., and Yamamuro, T.: Repair of Osteochondral Defects with Grafts of Cultured Chondrocytes. Comparison of Allografts and Isografts, *Clin Orthop* 302: 251-258, 1994.
14. Noguchi, T., Oka, M., Fujino, M., Neo, M., and Yamamuro, T.: Repair of Osteochondral Defects with Grafts or Cultured Chondrocytes. Comparison of Allografts and Isografts, *Advances in Orthopedic Surgery*. 19 (1): 52-54, 1995.
15. Puelacher, W. C., Kim, S. W., Vacanti, J. P., Schloo, B., Mooney, D., Vacanti, C. A.: Tissue-Engineered Growth of Cartilage: The Effect of Varying the Concentration of Chondrocytes Seeded onto Synthetic Polymer Matrices. *Int. J. Maxillofac. Surg.*, 23: 49-53, 1994.
16. Soames, R. W.: Structure of Cartilage. *Gray's Anatomy*, otuzsekizinci baskı, Bannister, L. H., Berry, M. M., Collins, P., Dyson, M., Dussek, J. E., Ferguson, M. W. J. (ed), Churchill Livingstone, GB, 443-452, 1995.
17. Vacanti, CA, Vacanti, JP: Bone and Cartilage Reconstruction. Principles of Tissue Engineering. Landes Company, Austin-Texas, 619-631, 1996.
18. Wakitani, S., Goto, T., Mansour, J. M., Goldberg, V. M., and Caplan, A. L.: Mesenchymal Stem Cell-Based Repair of a Large Articular Cartilage and Bone Defect, *Trans Orthop Res Soc* 19:481, 1994.
19. Yıldız, C., Bahçe, M., Başbozkurt M., Oğur G., Oğuz E., Deveci, S., Gür E.: Cultured Chondrocytes in Monolayer System, *Turkish J Bone Joint Surg* 3:88-93, 1997.

Yazışma adresi:

Dr. Cemil Yıldız

GATA Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı

06018 Etlik, Ankara, Türkiye

E-mail: e101414@orca.cc.metu.edu.tr

Fax: 312-3217778