



İnsülin, transferin ve selenöz asit preparatı kondrosit hücre sayısında artışa yol açar mı?

Alper GÖKÇE¹, İbrahim YILMAZ², Nevzat Selim GÖKAY³, Levent CAN⁴, Çiğdem GÖKÇE⁵

¹Nişantaşı Üniversitesi, İstanbul;

²Tekirdağ Devlet Hastanesi, Akılcı İlaç Kullanım Ekibi, Tekirdağ;

³İstanbul Esenyurt Üniversitesi, Esencan Hastanesi, İstanbul;

⁴Namık Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Tekirdağ;

⁵Üsküdar Sağlık Müdürlüğü, İstanbul

Amaç: Bu çalışmanın amacı insülin, insan transferin, selenöz asit (ITS) preparatının kondrosit çoğalması ve morfolojisi üzerine olumlu etkisi olduğu varsayımını test etmek ve bu eklenen maddelerin farklı hücre kültürü ortamlarındaki etkilerini biyokimyasal ve histolojik olarak araştırmak idi.

Çalışma planı: Gonartroz tanısı koyulan 57 yaşındaki bayan hastanın kıkırdak dokusundan insan kaynaklı kıkırdak hücreleri (*human cartilage-derived cell*, hCDC) ayrıştırıldı. Bu doku örnekleri DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) ve RPMI-1640 içerisinde kültüre alındı. Hücrelerin kondrojenik aktiviteleri gözlemlendi. Hücreler, yapılan pasajlamalar sonrası, 6. hafta sonunda dört gruba ayrıldılar. 14. gün sonunda sayıları artan hücrelerin x4, x10, x20 ve x40 büyütmede mikro fotoğrafları çekildi ve invert mikroskop altında incelendiler. Yaşayabilen hücre sayısı 1. ve 14. günde MTS-ELISA hücre proliferasyonu testi ile belirlendi.

Bulgular: ITS premiks ilave edilmeyen DMEM ve ITS premiks ilave edilen RPMI-1640 kültür ortamlarında kondrojenik hücrelerin sayısının arttığı olduğu görüldü. Bu çalışmada kondrositlerin canlılığı ve sayı artışının sadece DMEM içeren Grup 3'te daha fazla olduğu gözlemlendi.

Çıkarımlar: Kültür ortamı içeriklerinin osteokondral dokudan elde edilen hücre kültürlerindeki kondrosit hücre sayısının artmasında önemli rol oynadığını düşünüyoruz.

Anahtar sözcükler: DMEM; hücre kültürü; ITS premiks solüsyon; kondrojenik farklılaşma; RPMI-1640.

Hücreler buldukları kültür ortamlarının özelliklerine bağlı olarak farklı davranabilmektedirler.^[1,2] Primer hücre kültürleri ve kök hücrelerinin istenilen hücre tipine farklılaşmasını yönlendirmede hücre kültürlerinin ortam içerikleri (HKOİ) ve miktarlarının önemi bilinmektedir.^[1,2] HKOİ laboratuvar ortamında hücrelerin normal metabolik aktivitelerini sürdürebilmeleri için gerekli olan mikro

çevreyi sağlarken, adaptasyon kabiliyetine, hücre kaynağı ve organizmanın türüne göre farklılıklar gösterirler.^[1,2]

İn vitro hücre kültürü deneylerinde kullanılan hücrelerin canlılıklarının devamı ve çoğalmaları için HKOİ'ye eklenen aminoasit, karbonhidrat, lipit, vitamin ve iyonlar gibi katkı maddeleri hücreleri korur ve gelişimini destekler.^[1-4]

Yazışma adresi: Dr. Alper Gökçe, Nişantaşı Üniversitesi, İsmet Paşa Mah., Abdi İpekçi Cad., No: 89, 34030 İstanbul.

Tel: +90 212 – 337 32 32 e-posta: dralpergokce@yahoo.com

Başvuru tarihi: 09.02.2011 **Kabul tarihi:** 01.02.2012

©2014 Türk Ortopedi ve Travmatoloji Derneği

Bu yazının çevrimiçi İngilizce versiyonu
www.aott.org.tr adresinde
doi: 10.3944/AOTT.2014.2635
Karekod (Quick Response Code)



HKOİ hazırlanmasında, kullanılan kültür ortamlarının içerisine çeşitli katkı maddeleri ilave edilerek yapılmış çalışmalara rastlanmaktadır.^[5-16] Bu çalışmalarda, ayrıca, *in vitro* deneylerde eklenen katkı maddelerinin, uygun pH, sıcaklık ve nemin varlığında hücrelerin çoğalabilmeleri açısından çok önemli olduğu vurgulanmaktadır. Literatürde yer alan çalışmalarda, HKOİ'nin hücreler üzerindeki çoğaltıcı etkileri bugüne dek sayısal olarak saptanamamıştır.^[17]

Bu çalışmada, primer hücre kültürlerinin kondrosite farklılaşmasını yönlendirmek ve optimum hücre kültürünü elde edebilmek için ortam içeriklerinin hazırlanması aşamasında kültür medyumuna ve içerisine ilave edilmesi gereken katkı maddelerinin neler olması gerektiğini araştırmayı amaçladık.

Gereç ve yöntem

Bu çalışmada diğer araştırmalarda HKOİ olarak en sık kullanılan iki ticari ürün; DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, 1000 mg glucose/L; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, ABD) ve RPMI-1640 (Megacell RPMI Medium 1640 (x1) liquid; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Münih, Almanya) kullanıldı. Bu kültür ortamlarına zenginleştirici katkı maddesi olarak ITS premiks solüsyon (insülin, insan transferin, selenöz asit tozu (I 1884); Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, ABD) eklendi. Alınan hücre kültürleri proliferasyon ve farklılaşma açısından incelendi.

Diğer tedavilere yanıtız, semptomatik sağ gonartroz tanısıyla total diz protezi ameliyatı yapılan 57 yaşındaki bayan hastadan, yazılı onamı alınarak ameliyat sırasında rezeke edilen femur alt uç kondiler osteokondral doku artıkları RPMI-1640 ve DMEM içerisine alındı.

Osteokondral doku, 24 saat süre ile 37.4°C'de li-

yofilize Tip 2 kolajenaz enzim (1 mg/mL; Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, ABD) ile 24 saat boyunca işleme tabi tutuldu. Hücreler, daha sonra, 4°C'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Falkon tüpte dipte oluşan krem renkli hücre çökeltisine, önceden hazırlanmış olan penisilin-streptomisin (Penicillin-Streptomycin Solution; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Münih, Almanya) ve fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, ABD) eklendi. RPMI-1640 ve DMEM'ye çalışma gruplarına göre içerisine katkı maddeleri ilave edilerek hazırlanan HKOİ eklenip, hücreler 25 cm² yüzey alanına sahip T25 flakları (Tissue culture flask ürün no. 90151; TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, İsviçre) içerisine aktarıldı. İnsan kıkırdak hücreleri standart hücre kültürü koşullarında kültüre alındı. Altıncı haftada ve 6. pasajlarında %80-85 konfluansa ulaşan hücre kültürleri daha sonra 60 mm²'lik kültür petri kabına 4 ml hücre süspansiyonu içerisinde 1 ml HKOİ olacak şekilde deneye alındılar.

Hücre kültürleri istenen miktar konfluansa ulaştıklarında tripsinizasyon ile flaklardan toplandı. Canlı/ölü hücrelerin oranı %0.4'lük tripan mavisi kullanılarak, Thoma lamı yardımıyla saptandı. Sayımları yapılan canlı hücreler 4.7x10⁵ sayıda petri kapları içerisine ekildi.

Deney örnekleri HKOİ'lerine göre dört gruba ayrıldı. Grup 1'e RPMI-1640, Grup 2'ye RPMI-1640 ile birlikte ITS premiks solüsyonu, Grup 3'e DMEM, Grup 4'e ise DMEM ile beraber ITS premiks solüsyonu ilavesi yapıldı (Tablo 1).

Çalışma ve kontrol gruplarında 1. ve 14. günlerde yapılacak MTS canlılık ve toksisite analizleri için ekstra hücre grupları ayrıldı.

Her grupta yer alan ve primer hücre kültür ortamında bulunan süpernatantlar, iki günde bir, kendilerine özgü HKOİ ile değiştirildi.

Tablo 1. Gruplarına göre hazırlanan hücre kültür ortam içerikleri (HKOİ).

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
RPMI-1640 (1X) (Toplam HKOİ'de %88)	+	+	-	-
DMEM (1X) (1,000 mg glikoz/L) (Toplam HKOİ'de %88)	-	-	+	+
ITS premiks solüsyon [insülin (5 µg), insan transferin (5 µg), Selenöz asit (5ng/ml)] (Toplam HKOİ'de %1)	-	+	-	+
Fetal Sığır Serumumu (Toplam HKOİ'de %12)	+	+	+	+
Penisilin-Streptomisin (Toplam HKOİ'de %1)	+	+	+	+

İçinde primer hücre kültürü bulunan petri kapları 14 gün boyunca, %5 CO₂ ve 37.4°C'de, bir inkübatör (Thermo Scientific, 321-315684/467, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, ABD) içerisinde bekletildi. Her grubun kendi içeriğine göre HKOİ iki günde bir 5 ml'lik hacimde değiştirildi.

Grup 2 ve 4'teki HKOİ içerisine 5 ml'lik ITS pre-miks solüsyonu (insülin 5 µg, insan transferin 5 µg ve sodyum selenit 5 ng/ml karışımı) kondrositlere farklılaştırılmayı arttırmak amacıyla ilave edildi.

Histolojik değerlendirme için 1. ve 14. günlerde bir invert mikroskop (Olympus inverted microscope CKX41; Olympus Corp., Tokyo, Japonya) yardımıyla x4, x10, x20 ve x40 büyütmelemlerde mikro fotografik görüntüler alındı.

Canlılık testleri, 1. ve 14. günlerde, MTS formazan ticari kit (MTS Cell Titer 96[®], one solution Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay; Promega Corp., Madison, WI, ABD) yardımı ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi.

Canlılık ve toksisite testleri, 1. ve 14. günlerde, MTS ticari kit (100 ml MTS solüsyonu + 5 ml fenazine metosülfat: phenazine methosulfate solution [PMS]) yardımı ile makroskopik ve mikroskopik incelemelerle yapıldı.^[18-21] Bu amaçla, karanlık ortamda, 6 ml solüsyonda 1 ml MTS olacak şekilde ortam solüsyonu hazırlandı.

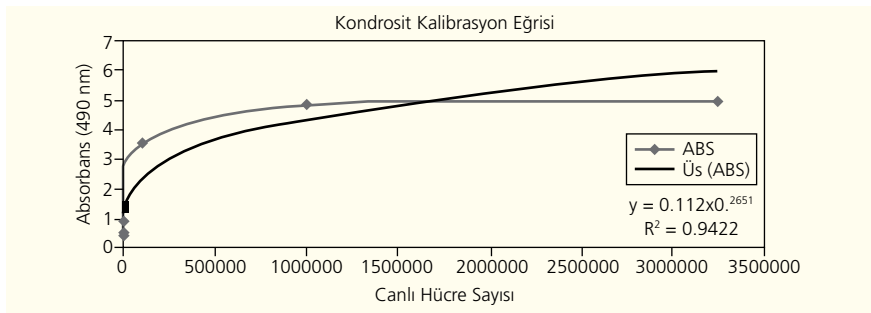
Birinci ve 14. günlerde, her hücre sınıfından birer adet fazladan hazırlanmış olduğumuz hücre sınıfları ve kontrol gruplarının içerisinde yer alan besi yerleri pipetör tabanca yardımıyla çekilip atıldı. MTS tetrazolyum bileşiği (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolyum) ve DMEM içeren kültür medyum solüsyon karışımından 2,500'er µL her bir petri kabına eklendi. Hücreler 3 saat inkübatörde (%5 CO₂ ve 37.4°C derecede) bekletildi.

Daha sonra deney grupları inkübatörden alındı. Reaksiyonun durdurulması için her kuyucuğa 125 µl %10 sodyum dodesil sülfat (%10 SDS L4522; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Münih, Almanya) eklendi. Petri kaplarındaki MTS'li solüsyonlardan 300'er µl çekilerek, 96-kuyucuklu plakaya aktarıldı ve ELISA Microplate Reader (MR-96A; Shenzhen Mindray Co. Ltd., Shenzhen, Çin Halk Cumhuriyeti) cihazında 490 nm dalga boyunda analiz edildi.

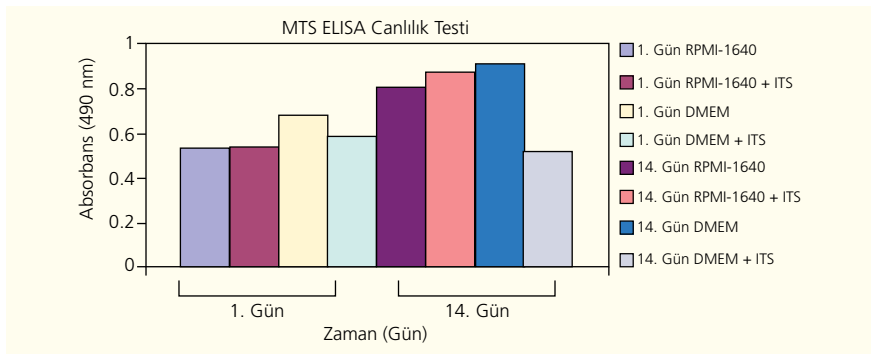
Elde edilen verilerin analizinde SPSS 17 paket programı kullanıldı. İstatistiksel analiz sonuçları hücre proliferasyonu üzerinden değerlendirildi. Gruplar arası karşılaştırmada varyans analizi (ANOVA) testi ve F-testinden yararlanıldı.

Bulgular

Hücre proliferasyonu değerleri ELISA plaka okuy-



Sekil 1. Birinci gün canlı hücre sayısı standart kalibrasyon eğrisi.



Sekil 2. Birinci ve 14. günlerde MTS ELISA canlılık testinde absorbans değerlerini gösteren grafik. [Bu şekil, derginin www.aott.org.tr adresindeki çevrimiçi versiyonunda renkli görülebilir.]

cusunda negatif kontrollerden elde edilen abzorban değerlerinin deney grubu değerlerine oranlanmasıyla yüzde bazında elde edildi. Kontrol grubundan elde edilen abzorpsiyon değeri %100 hücre canlılığı olarak dikkate alındı. Standart kalibrasyon eğrisi ile 1. ve 14. günlerde elde edilen canlı hücre sayısını ifade eden abzorban değerlerini gösteren grafikler karşılaştırmalı olarak Şekil 1 ve 2'de verilmiştir.

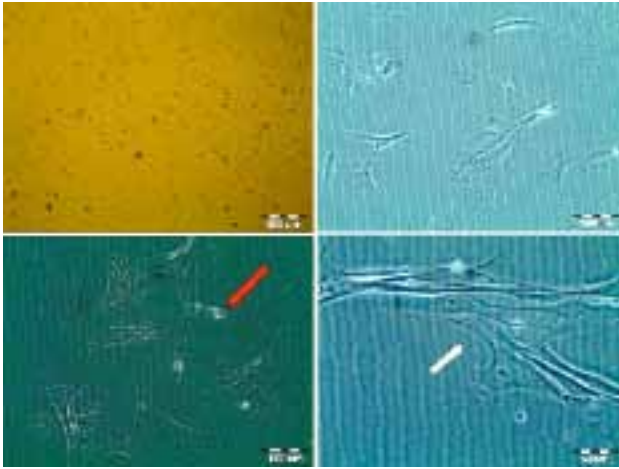
İlk gün sonunda, RPMI-1640 içeren birinci deney grubu (Grup 1) ile RPMI-1640 ile beraber ITS premiks solüsyon içeren ikinci deney grubu (Grup 2) arasında fark olmamasına rağmen, yalnızca DMEM içeren kültür ortamının bulunduğu üçüncü deney grubunda (Grup 3) canlı hücre sayısının fazlalığı göze çarpmaktaydı. Grup 1

ve Grup 2 arasındaki canlı hücre sayısı farkının 14. gün sonunda artmış olduğu ve canlı hücre sayısının Grup 2'de daha yüksek olduğu dikkat çekmekteydi.

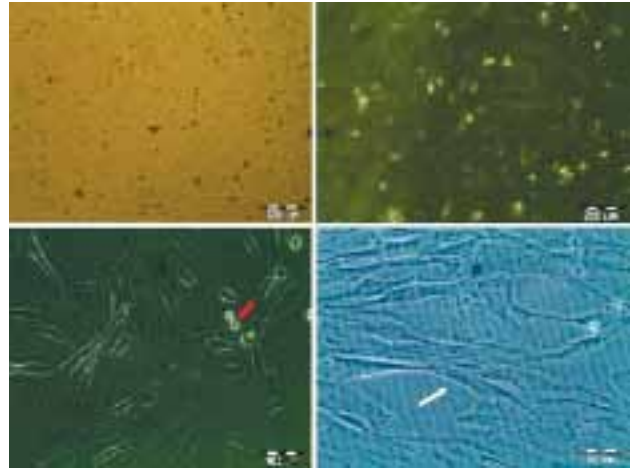
MTS ELISA analizleri sonucunda, 14. gün sonunda Grup 3'te yer alan hücrelerin sayısının en yüksek noktaya ulaştığı kaydedildi.

İnvert mikroskop görüntülerinin incelemesinde koloniler halinde üreme gösteren hücre sayısının 14. gün sonundaki artışları MTS ELISA canlılık testi ile de onaylandı. En fazla hücre artışının sırasıyla Grup 3, Grup 2 ve Grup 1'de olduğu görüldü. En az hücre artışı ise Grup 4'te gerçekleşti (Şekil 3-6).

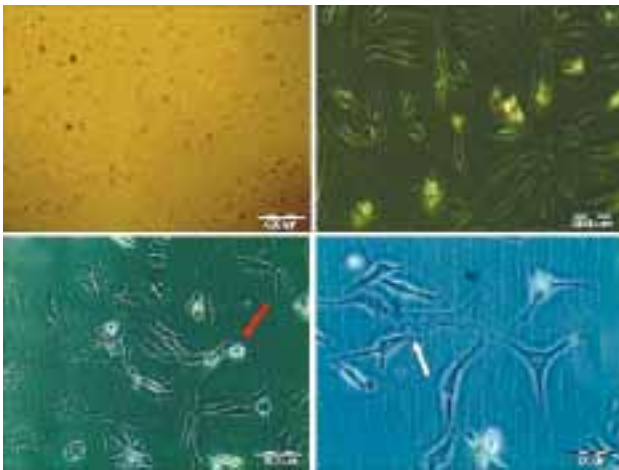
Birinci ve 14. gün MTS ELISA canlılık testi verile-



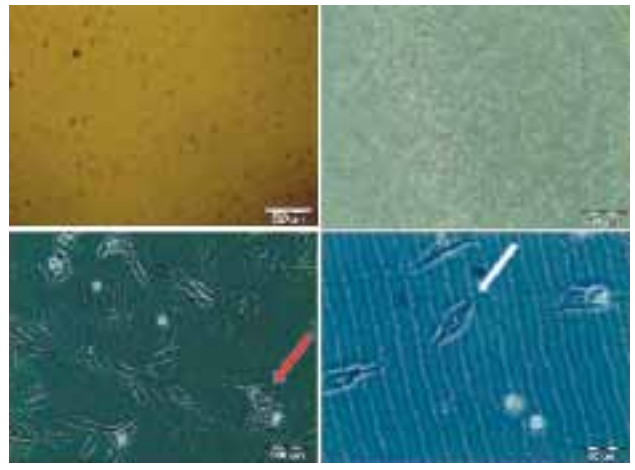
Şekil 3. İnsan kıkırdak dokusu kökenli kondrosit hücrelerinin 14. gün RPMI-1640 varlığında invert mikroskop (x4, x10, x20, x40) görüntüleri. [Bu şekil, derginin www.aott.org.tr adresindeki çevrimiçi versiyonunda renkli görülebilir.]



Şekil 5. İnsan kıkırdak dokusu kökenli kondrosit hücrelerinin 14. gün DMEM varlığında invert mikroskop (x4, x10, x20, x40) görüntüleri. [Bu şekil, derginin www.aott.org.tr adresindeki çevrimiçi versiyonunda renkli görülebilir.]



Şekil 4. İnsan kıkırdak dokusu kökenli kondrosit hücrelerinin 14. gün RPMI-1640 + ITS premiks solüsyon varlığında invert mikroskop (x4, x10, x20, x40) görüntüleri. [Bu şekil, derginin www.aott.org.tr adresindeki çevrimiçi versiyonunda renkli görülebilir.]



Şekil 6. İnsan kıkırdak dokusu kökenli kondrosit hücrelerinin 14. gün DMEM + ITS premiks solüsyon varlığında invert mikroskop (x4, x10, x20, x40) görüntüleri. [Bu şekil, derginin www.aott.org.tr adresindeki çevrimiçi versiyonunda renkli görülebilir.]

Tablo 2. Birinci gün gruplar arası MTS ELISA canlılık testi verilerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması.*

Zaman (Gün)	Karelerin toplamı	df	Karelerin ortalaması	F	p
1. Gün					
Gruplar arası	0.043	3	0.014	14338.000	0.0001
Grup içi	0.000	8	0.000		
Toplam	0.043	11			

*ANOVA

Tablo 3. On dördüncü gün gruplar arası MTS ELISA canlılık testi verilerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması.*

Zaman (Gün)	Karelerin toplamı	df	Karelerin ortalaması	F	p
14. Gün					
Gruplar arası	0.284	3	0.095	8.170	0.008
Grup içi	0.093	8	0.012		
Toplam	0.377	11			

*ANOVA

ri arasında, RPMI-1640, RPMI-1640 + ITS premiks solüsyon, DMEM ve DMEM + ITS premiks solüsyon içeren gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (sırasıyla, $p=0.0001$ ve $p=0.008$) (Tablo 2 ve 3).

Tartışma

Hücre kültürlerinde olması gereken temel aminoasit kombinasyonu ilk defa Eagle tarafından 1955'te tanımlanmıştır.^[18] Kendi ismini taşıyan *minimum Eagle's medium* (MEM) isimli besi yeri bazı modifikasyonlarla bugüne kadar gelmiştir. *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM) hücrelerin beslenebilmeleri için gerekli glikoz, aminoasit ve vitaminleri içerirken, canlılıklarını ve fonksiyonlarını sürdürebilmeleri için de uygun ozmolalite ve pH'a sahiptir.^[19] Memeli hücrelerinin kültürü için gerekli besi yerinin bileşenleri aminoasitler, vitaminler, tuzlar, glikoz, antibiyotikler ve serum içermektedir.^[20] Bu nedenle, çalışmanın amacına göre hücrelerin kültür ortamı ihtiyaçlarının belirlenmesi gerekir. Hücrelerin canlılıklarının devamı ve çoğalmaları için aminoasitler, karbonhidratlar, lipidler, vitaminler, iyonlar ve proteinlerin ortamda bulunmasının gerekliliği vurgulanmıştır.^[1] Besi yeri ihtiyacı hücrelerin tipine, adaptasyon kabiliyetine ve hücre kaynağı organizmanın türüne göre farklılık gösterebilir.

Kıkırdak hücrelerinin çoğalma ve farklılaşma gösterebilmeleri için hücre kültürü aşamasının iyi kontrol edilmesi gerektiği belirtilmiştir.^[17,21]

Ayrıca, yapılan çalışmalarda, hücrelerin çoğalma ve farklılaşmasında hücrelerarası ağın yapılmasını tetikleyecek araçların kullanılmasının gerekliliği de vurgulanmıştır.^[22-24] Elde edilen hücre sayısının azlığı ve bu

hücrelerin çoğalma ve farklılaşma yeteneklerinin kısıtlı olması, *in vitro* ve *in vivo* uygulamalar açısından dezavantaj oluşturmaktadır.^[25,26]

Klinik uygulamalarda, mezenkimal kök hücre kullanılarak elde edilen kıkırdak dokusu transplantasyon çalışmalarının uzun dönem sonuçları henüz ortaya konmamıştır. Bununla birlikte, bu hücre grubunun özelliklerinin ve biyolojik uyarılara yanıtlarının incelendiği çalışmalar, doku mühendisliğinin başarısı açısından umut verici ön sonuçlar sunmaktadır.^[20] Bu bağlamda, hücre kültürü çalışmalarının başarısı açısından HKOİ'lerin iyi seçilmesi gerekmektedir. Kondral lezyonların tedavisinde önemli bir ayrıntı, hücre çoğalmasını ve hücrelerarası ağ yapımını arttıran, hücre ölümü ve parçalanmasını azaltan yerel düzenleyicilerin kullanılmasının gerekliliğidir. Bu nedenle, hücreler ve yerel düzenleyicilerin bir arada bulunma koşullarının optimizasyonunun sağlanması gerekmektedir. Bu da karmaşık bir sürecin çözümü gerektirmektedir.^[20,21]

Gomez-Camarillo ve ark.,^[27] normal ve osteoartritli erkek Wistar sıçanların diz eklem kıkırdağında gerçekleştirdikleri çalışmalarında, kondrosit hücre çoğalmasında artışa teşvik edecek değişik kültür sistemlerini denemişlerdir. Kondrosit kültürlerinin çoğalma ve farklılaşmasında HKOİ olarak büyüme faktörleri ile, kontrol grubu olarak, içeriğinde fosfat tuz tampon çözeltisi, glikoz, sodyum ve sekonder fosfat (zayıf asidik pH) bulunan ve büyüme faktörü içermeyen DMEM karşılaştırmışlardır. Zenginleştirilmiş DMEM içindeki osteoartritli kıkırdaktan elde ettikleri kondrositlerin çoğalma sayısında anlamlı derecede artış kaydetmişlerdir.

Ceyhan ve ark.,^[28] ergin ve fetal Balb/c cinsi farelerin

kafatası kemiklerinden elde edilen osteoblast kültürleri üzerine yaptıkları çalışmalarında, oluşturdukları osteoblast hücre kültür tekniklerini standart hale getirmek için fetal ve dört ergin kalvaryumda DME-F12, diğer 6 ergin kalvaryumda ise RPMI-1640 ortamını kullanmışlardır. Embriyonik dokuların daha yüksek oranlarda kültüre edilebildiği ve HKOİ'nin, tıpkı kıkırdak hücre kültürü çalışmalarında olduğu gibi, kemik hücre kültürlerinde çoğalma ve farklılaşma başarısında önemli rol oynadığı görülmüştür.

Yu ve ark.,^[29] ise DMEM/F-12 içerisine askorbik asit-2-fosfat ve prolin ilavesi yapmışlardır. Kültüre aldıkları hücreleri deneysel olarak Yeni Zelanda tavşanlarında oluşturdukları tam kat kıkırdak defekti alanına yerleştirmişler ve 12 hafta sonunda dokuları histopatolojik olarak incelemişler ve ortama katılan maddelerin hücrelerin çoğalmasında önemli olduğunu vurgulamışlardır.

Priddy ve ark. da,^[30] yetişkin köpek kadavra humerus başı eklem kıkırdağından kondrositleri kültüre alıp hücrelerin morfolojileri ve hücre dışı matris oluşumlarını incelemişlerdir. HKOİ olarak RPMI-1640 (R), RPMI-1640 ile askorbat (RA), Ham's F-12 (F) ve Ham's F-12 ile beraber askorbat (FA) kullanmışlar ve dört grupta da 20 gün boyunca kondrositlerin meydana getirdiği matrisleri immünohistokimyasal olarak analiz etmişlerdir. Onuncu günden itibaren 20. güne kadar, grup R ve RA arasında kondrosit kümelerinin F ve FA arasındaki kondrosit kümelerine göre daha fazla glikozaminoglikan ve kollajen Tip 2 ürettiğini tespit etmişlerdir.

Zhang ve ark.^[31] ise, *in vitro* deney ortamında, keçi kemik iliğindeki mezenkimal kök hücrelerini kullanarak kondrojenik farklılaşmayı gözlemlemişlerdir. HKOİ olarak yüksek-glikoz içeren DMEM içerisine, insülin, transferin, C vitamini ve DXM katarak kondrojenik farklılaşmayı araştırmışlardır. Sitokimyasal boyama tekniği, RT-polimeraz zincir reaksiyonu ve Western blotlama yöntemlerini kullanarak, 1., 2. ve 4. haftalarda fenotipik kondrositlerin artışı gözlemlemişlerdir.

Fedewa ve ark.,^[10] HKOİ olarak, RPMI içerisine yüksek miktarda askorbik asit ilave etmişler, RPMI besi ortamını değiştirdiklerinde, kıkırdak kalınlığının azaldığını ve modülüsün yükseldiğini gözlemlemişlerdir.

Kılıç ve ark.^[32] ise yaşları 4 ay ile 18 yıl arasında değişen, sağlıklı 10 kemik iliği transplantasyon vericisi insandan aldıkları mezenkimal destek doku (stromal) hücrelerinin osteoblastik ve kondroblastik farklılaşma potansiyellerini araştırmışlardır. Tüm alt kültürler de dahil olmak üzere, mezenkimal stromal hücrelerin çoğalma ve farklılaşmasına göre HKOİ'nin belirlenmesi gerektiğini söylemişlerdir.

Çalışmamızı literatürdeki diğer deneysel araştırmalardan ayıran önemli özellikler; 1) İnsan kondrositlerinin kullanılarak kültür ortamları ve ilave edilen ITS premiks gibi katkı maddelerinin karşılaştırıldığı ilk deneysel çalışma olması, 2) Piyasada mevcut hücre kültürlerinde en sık kullanılan RPMI-1640 ve DMEM üzerindeki çoğaltıcı ve farklılaştırıcı etkisinin ITS premiks solüsyon varlığında gösterilebilmiş olması, 3) Bu farklılaşma ya da çoğalmanın HKOİ'ye büyüme hormonu eklenmeksizin meydana gelmiş olması şeklinde sıralanabilir.

Çalışmamızda, ITS ve DMEM'in ayrı ayrı kullanıldığında hücre çoğalmasına arttırıcı etki gösterdiğini belirledik. On dördüncü gün sonunda en az canlı hücre sayısı içeren grup, DMEM ile birlikte ITS premiks solüsyon içeren deney grubu idi. Bu durum, ITS premiks solüsyon içeriğinin DMEM ile uyumsuz bir kimyasal reaksiyon sonucu primer kondrosit kültürü üzerine toksik etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Bu sonucun bundan sonraki çalışmalarla doğrulanması gerekmektedir. Yine, bu sonuçlar, HKOİ ve HKOİ'lere ilave edilen katkı maddelerinin kondrosit sayısındaki artışa etkisine tekrar dikkat çekmektedir.

Çıkar örtüşmesi: Çıkar örtüşmesi bulunmadığı belirtilmiştir.

Kaynaklar

1. Bilir A, Ceyhan T, Altinoz MA, Guneri AD, Bayrak I, Altug T. Culturability of osteoblast cells extracted from mature and fetal BALB/c mice calvaria. [Article in Turkish] Acta Orthop Traumatol Turc 2000;34:389-95.
2. Bellows CG, Ciaccia A, Heersche JN. Osteoprogenitor cells in cell populations derived from mouse and rat calvaria differ in their response to corticosterone, cortisol, and cortisone. Bone 1998;23:119-25.
3. Wang Q, Zhong S, Ouyang J, Jiang L, Zhang Z, Xie Y, et al. Osteogenesis of electrically stimulated bone cells mediated in part by calcium ions. Clin Orthop Relat Res 1998;348:259-68.
4. Ishida Y, Bellows CG, Tertinegg I, Heersche JN. Progesterone-mediated stimulation of osteoprogenitor proliferation and differentiation in cell populations derived from adult or fetal rat bone tissue depends on the serum component of the culture media. Osteoporos Int 1997;7:323-30.
5. Dontchos BN, Coyle CH, Izzo NJ, Didiano DM, Karpie JC, Logar A, et al. Optimizing CO2 normalizes pH and enhances chondrocyte viability during cold storage. J Orthop Res 2008;26:643-50.
6. Ben-Galim P, Rand N, Giladi M, Schwartz D, Ashkenazi E, Millgram M, et al. Association between sciatica and microbial infection: true infection or culture contamination? Spine 2006;31:2507-9.

7. Tay LY, Herrera DR, Quishida CC, Carlos IZ, Jorge JH. Effect of water storage and heat treatment on the cytotoxicity of soft liners. *Gerodontology* 2012;29:e275-80.
8. Yang C, Hornicek FJ, Wood KB, Schwab JH, Choy E, Iafrate J, et al. Characterization and analysis of human chordoma cell lines. *Spine* 2010;35:1257-64.
9. Sastre S, Suso S, Segur JM, Bori G, Carbonell JA, Agustí E, et al. Cryopreserved and frozen hyaline cartilage imaged by environmental scanning electron microscope. An experimental and prospective study. *J Rheumatol* 2008;35:1639-44.
10. Fedewa MM, Oegema TR Jr, Schwartz MH, MacLeod A, Lewis JL. Chondrocytes in culture produce a mechanically functional tissue. *J Orthop Res* 1998;16:227-36.
11. Wu X, Lin M, Li Y, Zhao X, Yan F. Effects of DMEM and RPMI 1640 on the biological behavior of dog periosteum-derived cells. *Cytotechnology* 2009;59:103-11.
12. Zhang C, Hu YY, Cui FZ, Zhang SM, Ruan DK. A study on a tissue-engineered bone using rhBMP-2 induced periosteal cells with a porous nano-hydroxyapatite/collagen/poly(L-lactic acid) scaffold. *Biomed Mater* 2006;1:56-62.
13. Agata H, Asahina I, Yamazaki Y, Uchida M, Shinohara Y, Honda MJ, et al. Effective bone engineering with periosteum-derived cells. *J Dent Res* 2007;86:79-83.
14. Perka C, Schultz O, Spitzer RS, Lindenhayn K, Burmester GR, Sittlinger M. Segmental bone repair by tissue-engineered periosteal cell transplants with bioresorbable fleece and fibrin scaffolds in rabbits. *Biomaterials* 2000;21:1145-53.
15. Mizuno H, Hata K, Kojima K, Bonassar LJ, Vacanti CA, Ueda M. A novel approach to regenerating periodontal tissue by grafting autologous cultured periosteum. *Tissue Eng* 2006;12:1227-335.
16. Kim WS, Kim HK. Tissue engineered vascularized bone formation using in vivo implanted osteoblast-polyglycolic acid scaffold. *J Korean Med Sci* 2005;20:479-82.
17. Cirpar M, Korkusuz F. The future of treatment for chondral and osteochondral lesions. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2007;41 Suppl 2:153-9.
18. Sabatini M, Pastoureau P, De Ceuninck F. *Cartilage and Osteoarthritis: Cellular and molecular tools*. 1st ed. Vol. 1, New Jersey: Humana Press; 2004.
19. Leibovitz A. The growth and maintenance of tissue-cell cultures in free gas exchange with the atmosphere. *Am J Hyg* 1963;78:173-80.
20. Trehan K. *Biotechnology*. 2nd ed. New Age International (P) Ltd.; 2002.
21. Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am* 2004;86-A:1541-58.
22. Lynn AK, Brooks RA, Bonfield W, Rushton N. Repair of defects in articular joints. Prospects for material-based solutions in tissue engineering. *J Bone Joint Surg Br* 2004;86:1093-9.
23. Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. *Science* 2002;295:1009-14.
24. Köse GT, Korkusuz F, Korkusuz P, Hasirci V. In vivo tissue engineering of bone using poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid) and collagen scaffolds. *Tissue Eng* 2004;10:1234-50.
25. Risbud MV, Sittlinger M. Tissue engineering: advances in in vitro cartilage generation. *Trends Biotechnol* 2002;20:351-6.
26. Raghunath J, Salacinski HJ, Sales KM, Butler PE, Seifalian AM. Advancing cartilage tissue engineering: the application of stem cell technology. *Curr Opin Biotechnol* 2005;16:503-9.
27. Gomez-Camarillo MA, Almonte-Becerril M, Vasquez Tort M, Tapia-Ramirez J, Kouri Flores JB. Chondrocyte proliferation in a new culture system. *Cell Prolif* 2009;42:207-18.
28. Ceyhan T, Bilir A, Karaca C. Culturability of rat bone marrow stromal cells and evaluation for osteoblastic formation. [Article in Turkish] *Acta Orthop Traumatol Turc* 2006;40:67-71.
29. Yu FY, Lu SB, Huang LH, Xu WJ, Peng J, Zhao B, et al. Mechanisms of autologous chondrocytes mass transplantation in the repair of cartilage defects of rabbits' knee. *Zhongguo Gu Shang* 2010;23:683-7.
30. Priddy NH 2nd, Cook JL, Kreeger JM, Tomlinson JL, Steffen DJ. Effect of ascorbate and two different media on canine chondrocytes in three-dimensional culture. *Vet Ther* 2001;2:70-7.
31. Zhang XQ, Li X, Wu T, Li JW, DU H, Pei GX. [Isolation, culture and chondrogenic differentiation of goat bone marrow mesenchymal stem cells]. [Article in Chinese] *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2009;29:419-22. [Abstract]
32. Kiliç E, Ceyhan T, Cetinkaya DU. Evaluation of differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells to cartilage and bone cells. [Article in Turkish] *Acta Orthop Traumatol Turc* 2007;41:295-301.