

## İnterlökin-6 geni baskılanmış transgenik farelerde titanyum partiküllerinin osteolitik etkilerinin değerlendirilmesi

B. Alper Kılıç<sup>(1)</sup>, Ashraf Ragab<sup>(2)</sup>

*Titanyum ve titanyum alaşımları, vücut ortamında, diğer metallere oranla daha fazla aşınmaya uğramakta ve ortama salınan partiküller osteolize zemin hazırlamaktadır. Bu çalışma; titanyum partikülleri varlığında, interlökin-6'nun ( IL-6 ), osteoliz gelişimini ne şekilde etkileyeceğini ortaya koymak için tasarlandı. Bu amaçla; 20 adet transgenik dişi fare kullanıldı ve fareler iki ana guruba ayrıldı. On fareden oluşan ilk grup; IL-6 geni taşıyan, ikinci grup (10 fare); IL-6 geni baskılanmış farelerden oluşmaktaydı. Her iki gruptan 5'er fare kontrol amacıyla ayrıldı. Kontrol gurubu dışındaki farelerin kalvaryaları üzerine saf titanyum partikülleri yerleştirildi. Tüm fareler bir hafta sonra sakrifiye edilerek kalvaryaları çıkarıldı ve histomorfometrik inceleme yöntemi kullanılarak, osteolitik alanlar değerlendirildi. IL-6 geni baskılanmış grupta; anlamlı derecede daha az osteoliz geliştiği saptandı ( $p < 0.05$ ) ve titanyum partiküllerinden kaynaklanan osteoliz gelişimi sürecinde, IL-6'nun önemli bir rolü olduğu sonucuna varıldı.*

**Anahtar kelimeler:** Titanyum, interlökin-6, osteoliz

### *The evaluation of osteolysis resulting from titanium particles in -Interleukin-6 gene knocked out- transgenic mice*

*Titanium and titanium alloys which are used for components of total joint replacement prosthesis have been shown to generate more wear debris. The cellular response to titanium is characterized by release of tumor necrosis factor (TNF) from macrophages and prostaglandin E2 (PGE2) from osteoblasts. The presence of numerous macrophages at the interface of a loose prosthesis may lead to increased levels of cytokines (i.e. TNF, interleukin-1, 6, 11). This study was designed to define the role titanium debris plays in osteolysis and to indicate the importance of interleukin-6 (IL-6) in this process. Twenty female transgenic mice were used for this purpose. They were divided into two groups. First group (10 mice) had IL-6 gene whereas second group hadn't (IL-6 gene was knocked-out). Five mice were used as control from each group. Commercially pure titanium particles were placed on calvarias of mice except controls. They all were sacrificed after one week and their calvarias were harvested. Investigation was done histomorphometrically. The group which had not IL-6 gene indicated significantly less osteolysis than the other group ( $p < 0.05$ ). We conclude that IL-6 had an important role in osteolysis resulting from titanium particles.*

**Keywords:** Titanium, interleukin-6, osteolysis

Giderek artan sayılarda kullanılan eklem protezlerinin üretilmesinde; demir, kobalt ve titanyum olmak üzere, başlıca üç temel metalin alaşımları kullanılmaktadır (5). Vücut ortamında, zamanla, implantların aşınması sonucu ortaya çıkan metal partiküllerinin, kemik rezorbsiyonuna yol açarak, protezlerin aseptik gevşemesine neden olduğu bilinmektedir (2).

Titanyum ve alaşımları, diğer metal alaşımlarına göre, daha düşük korozyon ve toksisite oranlarına sahiptir (4, 5, 10, 14). Bununla birlikte, zamanla aşınarak ortama serbest metal partikülleri salma oranı, titanyum için daha yüksektir (4, 14). Titanyum alaşımları üzerinde yapılan çalışmalarda, metal üzerinde osteoblastların gelişiminin, kobalt alaşımlarına göre daha fazla olduğu saptanmıştır (6). Saf titanyum üzerinde ise, kemik, metale kimyasal bağlarla bağlanmakta ve gerek titanyum alaşımlarına, gerekse diğer metal alaşımlarına oranla, çok daha güçlü bir osseointegrasyon gelişmektedir (15). Titanyum-alüminyum-vanadyum alaşımı partiküllerinin; prostaglandin

E2 (PGE2), interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktörü'nün (TNF) salınımını indüklediği gösterilmiştir (10, 17). Bu mediatörlerin; kemik rezorbsiyonunu stimüle eden ve dolayısıyla aseptik gevşemeye yol açan etkileri olduğu belirlenmiştir (10, 11, 16, 18, 22).

Transgenik hayvanlar; insan hastalıkları için model oluşturma, yeni tedavi yöntemleri deneme, ekonomik değeri yüksek proteinlerden çok miktarda elde edilebilecek gibi amaçlarla, laboratuvarlarda genleri ile oynanarak üretilen hayvanlardır. Bu amaçla, önce "transgen" adı verilen ve hayvana nakledilecek olan, DNA oluşturulmaktadır. Oluşturulan bu DNA'nın, nakledildiği hayvanda ve sonraki kuşaklarda, kendine ait özellikleri gösterecek şekilde yer alması sağlanmaktadır (12, 20, 21). En başarılı sonuçları veren ve dünyada en yaygın olarak kullanılan transgenik hayvanlar, farelerdir (21).

Bu çalışmada; IL-6 üretmeyecek şekilde genleri baskılanmış ve IL-6 genleri baskılanmamış transge-

(1) Research Fellow; Case Western Reserve University Tıp Fakültesi, Ortopedi Bölümü, Yrd. Doç. Dr.

(2) Resident; Case Western Reserve University Tıp Fakültesi, Ortopedi Bölümü, Assistant Dr. USA

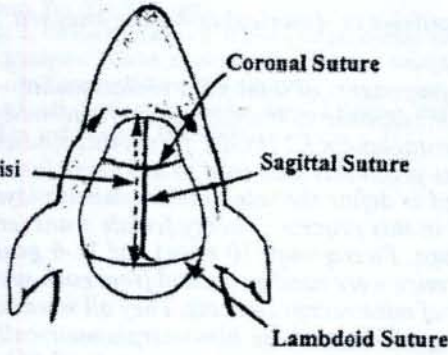




Şekil 1: Steril şartlarda ameliyat edilen transgenik fare görülmektedir



Şekil 3: Fare kalvaryasının ekran üzerindeki görüntüsü izlenmektedir. Frontal\* ve parietal\*\* kemikler üzerindeki osteolitik bölgeler, oklarla işaretlenmiştir



Şekil 2: Fare kalvaryası, parietal-frontal kemikler ve insizyon çizgisi, şematik olarak gösterilmiştir

nik fareler kullanılmıştır ve IL-6'nın, titanyum partiküllerinden kaynaklanan osteoliz üzerinde, etkili olup, olmadığı araştırılmıştır.

## Gereç ve yöntem

Çalışmada kullanılan transgenik fareler; "The Jackson Laboratory / Maine"de hazırlandı. Hazırlanan 20 adet farenin 10'unda; IL-6 geni baskılanmışken, kalan 10 fare; IL-6 üretebilme yeteneğine sahipti. C57 Black türündeki 5 haftalık dişi farelerin ağırlığı 15-18g arasındaydı.

Cerrahi yöntem: Anestezi; farelere 100mg/kg Ketamine ve 20 mg/kg Xylazine karışımının i.m. yolla verilmesiyle gerçekleştirildi. Steril şartlarda, skalp üzerine, sagittal suture paralel olacak şekilde, longitudinal bir insizyon uygulandı (Şekil 1). Parietal ve frontal kemikler tamamen görülecek şekilde dokular serbestleştirildi ve bu kemiklerin üzerindeki periost sıyrıldı (Şekil 2). Her iki gruptan 5'er farenin bu şekilde hazırlanmış kalvaryaları (kafatası) üzerine, % 70 oranında süspansiyon olarak hazırlanmış 40 µl'lik (40 mikrolitre), saf titanyum partikülleri, damlalık yardımıyla ve tüm kemik yüzeyine temas edecek şekilde yerleştirildi. Kontrol amacıyla kulla-

nılacak olan ikinci 5'er farenin kalvaryaları üzerine ise; % 99 oranında fosfat buffer saline+%1 oranında penisilin (10.000 IU/ml) ve streptomisin (10.000 µml) karışımı içeren 40µl'lik solusyon, aynı şekilde uygulandı. Skalp, 5/0 prolene dikiş materyali kullanılarak kapatıldı. Bir hafta süreyle izlenen farelerde, insizyon bölgesinde enfeksiyon bulgusu gibi, herhangi bir komplikasyonla karşılaşılmadı. Farelerin tümü, uygulamadan 1 hafta sonra sakrifiye edildi. Yalnızca parietal ve temporal kemikleri içerecek şekilde kalvaryaları çıkarılarak, histomorfometrik inceleme amacıyla ilgili birime gönderildi.

Histomorfometrik yöntem: Parietal ve frontal kemiklerin röntgen grafileri, Faxitron X-ray yöntemiyle, özel lamalar üzerine alındı. Bu lamalar, önce 1996 yapımı Nikon marka mikroskop yardımıyla, x25 büyütme altında değerlendirildi. Daha sonra bu görüntüler, "Bioquant 1996 ve true color windows 95" programlarıyla yüklü ve mikroskoba bağlı olan bilgisayar sisteminin ekranına yansıtıldı. Ekranda, kemikler üzerindeki osteolitik alanlar işaretlendi (boyanarak) ve osteolitik alanların yüzdeleri hesaplandı (Şekil 3).

İstatiksel değerlendirme: Sonuçlar; ortalama (SD) olarak ifade edildi. İstatiksel değerlendirme, SPSS for Windows (version 5.0) kullanılarak, Mann-Whitney U testi ile elde edildi. İstatiksel önemlilik için; p<0.05 değeri kullanıldı.

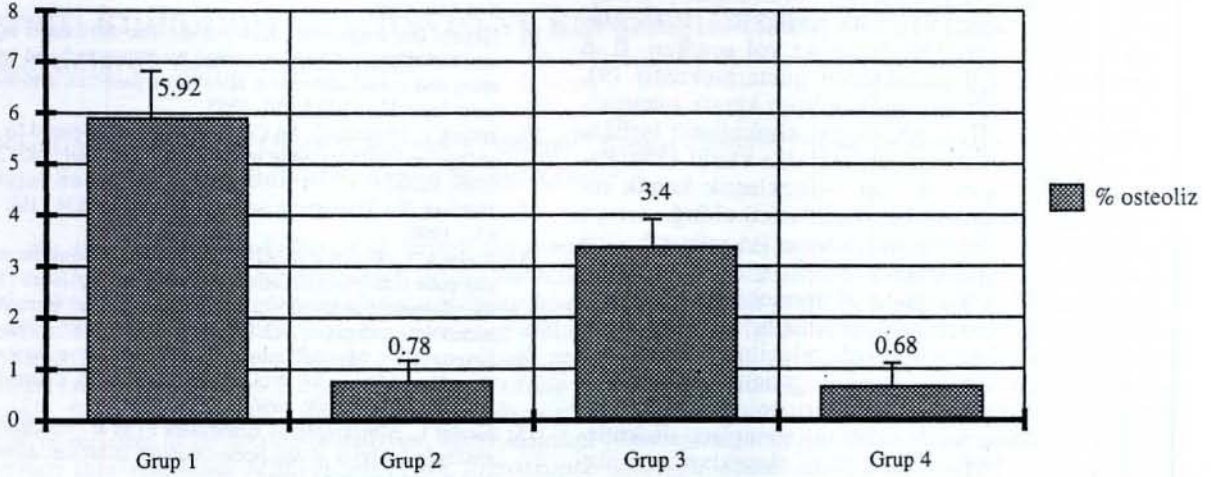
## Sonuçlar

Kemik osteolitik alan yüzdeleri; IL-6 geni baskılanmamış ve titanyum partikülleri verilen 5 farede ortalama  $5.92 \pm 1.01$ 'ken (Grup 1), kontrol olarak kullanılan aynı gruptaki diğer 5 farede  $0.78 \pm 0.13$  (Grup 2) şeklindeydi.

IL-6 geni baskılanmış grupta; titanyum partikülleri uygulanan 5 farede ise, osteolitik alan yüzdesi ortalama  $3.40 \pm 0.36$  (Grup 3) olarak bulunurken, aynı grupta kontrol amaçlı kullanılan diğer 5 farede bu değer  $0.68 \pm 0.16$  (Grup 4) olarak hesaplandı. Bu



## Osteolitik alan yüzdesi



Şekil 4: Grupların, ortalama osteolitik alan yüzdeleri

sonuçlar grafik halinde gösterildi (Şekil 4).

Grup 1 ve Grup 3 karşılaştırıldığında, Grup 3'te anlamlı derecede daha az osteoliz gelişmiş olduğu görüldü ( $p < 0.05$ ). Grup 1 ve Grup 3'ün osteolitik alan yüzdelерinin, kontrol gruplarına göre (Grup 2 ve Grup 4), anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptandı ( $p < 0.05$ ). Kontrol gruplarının (Grup 2 ve Grup 4) kendi aralarında yapılan karşılaştırmalarında, anlamlı bir fark bulunmadı ( $p > 0.05$ ).

## Tartışma

Total eklem protezi uygulamalarından sonra, farklı nedenlerle, "aseptik gevşeme" komplikasyonu ile karşılaşılabilir (2). Uygun cerrahi tekniğin kullanılması ve implant fiksasyonunun başlangıçta iyi yapılmış olması, uzun dönemde aseptik gevşemeyi engelleyememektedir (2, 8). Kullanılan implantlar, zamanla, vücut ortamı ve sürtünme gibi etkilerle aşınarak (wear), çevre dokulara partiküller vermektedir. Bu partiküllerin makrofajları aktive etmesiyle, önce bir enflamasyon süreci başlamakta, bunu kemik rezorpsiyonu (osteoliz) izlemekte ve bu tablo, protezde gevşeme ile sonlanmaktadır (2, 5, 8, 10, 17). Protezlerin üretilmesinde kullanılan metal alaşımlarının, vücut dokularıyla en mükemmel uyumu gösterebilmeleri için, çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Son yıllarda, titanyum ve alaşımları dikkat çekmektedir. Yapılan bazı çalışmalar; osteoblastların, titanyum alaşımları üzerinde, diğer metallere oranla daha iyi tutunduğunu ve özellikle saf titanyumun kemikle daha da iyi bağlandığını göstermektedir (5, 6, 15). Titanyum ve alaşımları; vücut sıvıları ortamında, diğer metal alaşımlarına göre, korozyona karşı daha dirençlidir (4, 5, 14). Kobalt, krom alaşımlarına göre, çevre dokuya (periprotetik doku) daha az toksik etkilidir (10). Bütün bunlara karşılık, titanyum ve alaşımlarının, diğer metal alaşımları ile karşılaştırıldığında, vücut ortamında daha fazla aşınmaya uğradıkları ve ortama daha fazla metal partiküller verdikleri görülmektedir (4, 5, 14, 23). Bu partiküller; PGE2

gibi enflamasyon mediatörlerini salgılatarak, osteolize zemin hazırlamaktadır (7, 9, 10, 17). Yapılan çalışmalar; osteolizin gelişiminde, bu mediatörlerin yanısıra, TNF ve interlökinler gibi sitokinlerinde rol oynadığını göstermektedir (2, 3, 13). Titanyum alaşımı partiküllerinin, PGE2 ve TNF'nin yanısıra, IL-1 ve IL-6 salınımını da indüklediği saptanmıştır (10). TNF ve interlökinler (IL-1, IL-6, IL-11); osteoklast gelişimini stimüle ederek, kemik rezorpsiyonuna yol açmaktadır (18). Acaba; osteolizin gelişiminde, tek bir interlökin mi, yoksa tüm interlökinler birlikte mi etkili olmaktadır?

Bu in-vivo çalışma; titanyum partikülleri etkisine maruz kalan kemikte, tek başına IL-6'nın, osteoliz gelişiminde ne derece etkili olduğunu araştırmak için gerçekleştirilmiştir. IL-6; multifonksiyonel bir sitokindir ve normalde dolaşımdaki seviyesi düşüktür, ancak, patolojik uyarıların etkisiyle yapımı hızla artabilmektedir. Fare fetusunda; metakarplar ve kalvaryaya üzerinde yapılan çalışmalarda, IL-6'nın kemik rezorpsiyonunu artırdığı gösterilmiştir (11, 16). Kemik üzerinde etkili olan östrojen ve androjen gibi hormonların, kemik iliğinde de üretilen sitokinlerin ortaya çıkmasında ve düzenlenmesinde etkili oldukları bilinmektedir. Bu hormonların yokluğunda sitokinlerin etkisi artmakta, dolayısıyla osteoklast aktivitesi ve kemik yıkımı fazlaşmaktadır (18). Bu noktadan yola çıkılıp, bir grup farede, cinsiyet hormonları ve IL-6 geni baskılanmış, beklenenin aksine, osteoklast aktivitesinde ve kemik rezorpsiyonunda artış olmadığı gösterilmiştir (18). Bu son iki deneysel çalışmanın sonuçlarıyla, bizim sonuçlarımız paralellik göstermektedir. Çalışmamızda; titanyum partikülleri uygulanan farelerden, IL-6 geni baskılanmış olanlarda, baskılanmamış olanlara oranla, anlamlı derecede daha az osteoliz geliştiği gözlenmiştir. Bununla birlikte, IL-6 geni baskılanmış grupta kontrol gruplarından daha fazla osteoliz gelişmesi, IL-6'nın osteoliz gelişiminde rolü olduğunu, ancak, tek başına belirleyici olmadığını düşündürmektedir. Bu konuda, farklı sonuçlar gösteren deneysel çalışmalar da vardır. Örneğin; yenidoğan farelerde kalvaryaya üzerine infüz-



yon şeklinde IL-6 verilmiş, ancak, IL-6'nın kemik rezorpsiyonunu stimüle etmediği görülmüştür (1). Başka bir araştırma; saf titanyum partikülleriyle karşılaşan makrofajların, TNF'de artışa yol açarken, IL-6 seviyesini değiştirmediklerini göstermektedir (9). Östrojen eksikliği sırasında gelişen kemik rezorpsiyonunda, IL-1, IL-6, sIL-6 gibi sitokinlerin birlikte rol aldıklarını gösteren çalışmalarda vardır (19). Farelere; tek başına IL-1'in, osteoklastik kemik rezorpsiyonunun potent bir stimülatörü olduğu ortaya konmuştur (3). Bizim çalışmamız ise yalnız başına IL-6 baskılandığında bile, osteoliz oranında anlamlı düzeyde azalma olduğunu göstermektedir. Çalışmamız ve bütün benzer diğer çalışmalar; titanyum bazlı implantların daha sağlıklı kullanılabilmesi için, "IL-6 ve diğer sitokinlere, gelecekte, genetik yolla müdahale edilmeli mi?" sorusunu tartışmaya açmaktadır. Bununla birlikte, farklı araştırma sonuçları, sitokinlerin tek, tek ve birlikte nasıl etkili olacakları, organizmadaki başka fonksiyonlarının ne yönde değişeceği ve sonuçların insana nasıl uyarlanacağı gibi sorunlar hemen akla gelmektedir ve bu konu üzerinde daha pek çok araştırma yapılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

## Kaynaklar

- Al-Humidan A, Ralston SH, Hughes DE et al: Interleukin-6 does not stimulate bone resorption in neonatal mouse calvariae. *J Bone Min Res*, 6 (1): 3-8, 1991.
- Amstutz HC, Campbell P, Kossovsky N et al : Mechanism and clinical significance of wear debris-induced osteolysis. *Clin Orthop* 276:7-16, 1992.
- Boyce BF, Aufdemorte TB, Garret IR et al : Effects of interleukin-1 on bone turnover in normal mice. *Endocrinology*, 125 (3):1142-1151, 1989.
- "Dan" Daniels AU, Tooms RE, Harkess JW: Arthroplasty; introduction and overview. In *Campbell's Operative Orthopaedics*. Canale ST, Vol 1, 9th ed, pp:221-231, Mosby-Year Book Inc, St, Lois, 1998.
- Galante JO, Lemons J, Spector M et al : The biologic effects of implant materials. *J Orthop Res*, 9: 760-775, 1991.
- Goldring SR, Flannery MS, Petrisson KK et al: In vitro model for characterization of the biochemical and cellular responses to orthopedic implant materials. *Trans Orthop Res Soc*, 14: 495, 1985.
- Goldring SR, Kroop SF, Petrisson KK et al : Metal particles stimulate prostaglandin E2 (PGE2) release and collagen synthesis in cultured cells. *Trans Orth Res Soc*, 15: 444, 1990.
- Goldring SR, Schiller AL, Roelke MS et al : The synovial-like membrane at the bone-cement interface in loose total hip replacements and its proposed role in bone lysis. *J Bone and Joint Surg* 65 (A): 575-584, 1983.
- Gonzales JB, Purdon MA, Horowitz SM : In vitro studies on the role of titanium in aseptic loosening. *Clin Orthop* 330: 244-250, 1996.
- Haynes DR, Rogers SD, Hay S et al : The differences in toxicity and release of bone-resorbing mediators induced by titanium and cobalt-chromium alloy wear particles. *J Bone and Joint Surg* 75 (A):825-834, 1993.
- Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH et al : IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol*, 145: 3297-3303, 1990.
- Jaenisch R : Transgenic animals. *Mol Med*, 334 (10): 653-655, 1996.
- Kadoya Y, Revell PA, Al-Saffar N et al : Bone formation and bone resorption in failed total joint arthroplasties : histomorphometric analysis with histochemical and immunohistochemical technique. *J Orthop Res*, 14: 473-482, 1996.
- Lemons JE : Metallic alloys. In *Reconstructive Surgery of the Joints*. Morray BF, Vol1, 2nd ed, pp:19-28, Churchill Livingstone, New York, 1996.
- Linder L, Albrektsson T, Branemark PI et al : Electron microscopic analysis of the bone-titanium interface. *Acta Orthop Scand* 54: 45-52, 1983.
- Löwik CWGM, vander Pluijm G, Bloys H et al : Parathyroid hormone (PTH) and PTH-like protein (PLP) stimulate interleukin-6 production by osteogenic cells: a possible role of interleukin-6 in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 162: 1522-1546, 1989.
- Maloney W, Smith RL : Periprosthetic osteolysis in total hip arthroplasty: the role of particulate wear debris. *J Bone and Joint Surg*, 77 (A):1448-1461, 1995.
- Manolagas SC : Role of cytokines in bone resorption. *Bone "Suppl"*, 17 (2): 63-67, 1997.
- Miyaura C, Kusano K, Masuzawa T et al: Endogenous bone-resorbing factors in estrogen deficiency: cooperative effects of IL-1 and IL-6. *J Bone Min Res*, 10 (9):1365-1373, 1995.
- Nomura T : Practical development of genetically engineered animals as human disease models. *Lab Anim Sci*, 47 (2):113-117, 1997.
- Shuldiner AR : Transgenic animals. *Mol Med*, 334 (10): 653-655, 1996.
- Suda T, Udagawa N, Nakamura I et al : Modulation of osteoclast differentiation by local factors. *Bone "Suppl"*, 17 (2): 87-91, 1995.
- Thornhill TS, Oxuna R, Shortkroff S et al : Biochemical and histological evaluation of the synovial-like tissue around failed (loose) total joint replacement prostheses in human subjects and a canine model. *Biomaterials*, 11:69-72, 1990.

## Yazışma adresi :

Yrd. Doç. Dr. B. Alper Kılıç,  
İnönü Mah, 3. Cad, Yargı 1 Sitesi,  
No: 20 / 4, Batıkent, Ankara, Türkiye