



**T.C
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**BONE MORFOJENİK PROTEİN-2 VE DESFEROKSAMİN' İN
DİSTRAKSİYON OSTEOGENEZİSİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. Emre KALAY

UZMANLIK TEZİ

BURSA-2016



**T.C
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**BONE MORFOJENİK PROTEİN-2 VE DESFEROKSAMİN' İN
DİSTRAKSİYON OSTEOGENEZİSİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. Emre KALAY

UZMANLIK TEZİ

BURSA-2016



**T.C
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**BONE MORFOJENİK PROTEİN-2 VE DESFEROKSAMİN' İN
DİSTRAKSİYON OSTEOGENEZİSİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. Emre KALAY

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Bartu SARISÖZEN

BURSA-2016

İÇİNDEKİLER

Türkçe Özet.....	ii
İngilizce Özet.....	iii
GİRİŞ.....	1
Ekstremitte uzatılması ve distraksiyon osteogenezisi.....	2
Desferoksamin ve HIF-1'in stabilizasyonu.....	4
Bone morfojenik protein-2.....	8
GEREÇ VE YÖNTEM.....	10
Cerrahi teknik	10
BMP-2 hazırlanışı.....	11
Mekanik test.....	13
Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Değerlendirme.....	14
İstatistiksel Değerlendirme	15
BULGULAR	17
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	31
KAYNAKLAR	35
TEŞEKKÜR	43
ÖZGEÇMİŞ.....	44

ÖZET

Çalışmada tavşanlar üzerinde oluşturulan distraksiyon osteogenezisi modelinde lokal uygulanan desferoksamin (DFO) ve bone morfojenik protein 2' nin (BMP-2) kemik oluşumu üzerine etkisi incelenmiştir. Bunun için 8' er tavşandan oluşan kontrol, DFO ve BMP-2 grupları planlandı. Tüm tavşanların sağ tibia diafizine osteotomi uygulanarak mini eksternal fiksator ile tespit edildi, 15 gün süreyle günde iki kez 0,3 mm distraksiyon uygulandı. BMP-2 grubunda BMP-2 emdirilmiş hemostatik jelatin sünger osteotomi hattına yerleştirildi. DFO grubunda DFO distraksiyon boyunca osteotomi hattına lokal uygulandı. 38. Gün sonunda, oluşan rejeneratta histolojik olarak yeni kemik oluşumu, immünohistokimyasal olarak doku VEGF aktivitesi değerlendirildi ve mekanik olarak üç nokta eğilme testi yapıldı.

Yeni kemik oluşumu gruplar arasında farklılık göstermedi ($p > 0.05$). VEGF skoru deney gruplarında daha yüksek olarak saptandı, arasındaki fark istatistiksel anlamda farklılık göstermedi ($p > 0.05$). Üç nokta eğilme testi ile yapılan incelemelerde kuvvet ve eğilme momenti, BMP-2 grubunda DFO ve kontrol gruplarından daha yüksekti ($p < 0.05$).

Lokal olarak uygulanan DFO ve BMP-2, VEGF düzeyini arttırmaktadır. Ancak VEGF düzeyi ve yeni kemik oluşumunda gözlenen farklılıklar istatistiksel düzeyde anlamlı değildi. Üç nokta eğilme testinde oluşan rejeneratın BMP-2 grubunda mekanik olarak daha dayanıklı olduğu saptandı. Distraksiyon osteogenezisinde VEGF etkinliğinin artırılması gelecek için umut vaad etmektedir. Bu amaca yönelik olarak deneysel distraksiyon osteogenezisi modellerinde anjiogenezis uyarımının ve farklı biyomekanik koşulların etkileşimini inceleyen yeni çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar kelimeler: distraksiyon osteogenezisi, desferoksamin, bone morfojenik

SUMMARY

Our research focuses on locally applied desferrioxamine (DFO) and bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) rabbits. Control, DFO and BMP-2 groups were planned and each group had 8 rabbits. All rabbits operated with osteotomy on right tibia diaphysis located by external fixator and 0,3 mm distraction performed two times a day for 15 days. For BMP-2 Group, BMP-2 implemented absorbable haemostatic gelatine was placed to osteotomy line. For DFO Group; DFO was locally applied along all distraction period. New bone formation, immunohistochemical tissue VEGF activity and mechanical three-point bending test noted in regenerate after 38th day.

No significant difference had been detected on new bone formation for all three groups ($p > 0.05$). Even though higher scores were noted in experimental groups, there was no significant difference for VEGF score for all groups ($p > 0.05$). On three-point bending test, BMP-2 Group's strength was higher than DFO and control Groups and significant difference was detected ($p < 0.05$). BMP-2 Group's moment of flexion was higher than DFO and control Groups and significant difference was detected on examinations made with three-point bending test ($p < 0.05$).

Locally applied DFO and BMP-2 increased VEGF level but new bone formation was statistically insignificant because of negative biomechanical conditions. In three-point bending test, formed regenerate was noted as mechanically more enduring in BMP-2 group. Increased VEGF activity in distraction osteogenesis promises progress for future. New studies on distraction osteogenesis models' angiogenesis stimulation and different biomechanical conditions' interaction aimed at this purpose are needed.

Keywords: distraction osteogenesis, desferrioxamine, bone morphogenetic protein 2

GİRİŞ

Kemik dokusu yüksek onarım ve rejenerasyon özelliklerine sahip, kırık iyileşmesi ve iskelet gelişimi esnasında kemik oluşumu ve anjiogenezis'in beraber ilerlediği bir dokudur. Doğru kemik rejenerasyonu ve kırık iyileşmesi için hipoksi ve anjiogenik faktörlerin ortaya çıkmasının önemi gösterilmiştir (1,2). Yeterli kemik hemostazının gerçekleşmesi için; endotel hücrelerinin, anjiogenik faktörlerin, osteoblastların ve osteoklastların etkileşimlerinin belirlenmesi ile vasküler yapı kemik patolojilerinin tedavilerinin planlanmasında büyük role sahip olmuştur.

Distaksiyon osteogenezi iskelet sistemi deformitelerinde önemli bir tedavi şeklidir. Distaksiyon osteogenezi sırasında vasküler yapılar yeniden şekillenir (anjiogenezis) ve yeni vasküler yapılar oluşur (vaskülogenezis) (3,4). Anjiogenezis ve vaskülogenezis moleküler etkileşimler ile uyarılmaktadır. Anjiogenik faktörler endotel hücrelerini uyarır ve endotel hücreleri yer değiştirerek tübüler yapılarını oluşturur. Anjiogenik faktörler dışında hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF) yolunun kontrolü altındaki doku hipoksisi, anjiogenezis için önemli bir itici güçtür (5). Hipoksi ile indüklenebilir faktör – 1 transkripsiyon faktörünün stabilizasyonu ile vasküler endotelyal growth faktörü (VEGF) ekspresyonu uyarılır (6).

Demir şelatörü olarak bilinen desferoksamin (DFO) prolin hidroksisilaz (PHD) ve hipoksi inibe eden faktör -1 (FIH-1) inhibisyonu yaparak HIF stabilizatörü olarak görev yapar (7,8).

Bone morfojenik protein -2 (BMP-2) güçlü bir osteojenik büyüme faktörüdür, osteoprogenitör hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlar. Aynı zamanda dolaylı anjiogenik etkisi vardır. Osteoblastlardan VEGF üretimini uyarır ve endotel hücreler için önemli bir kemoatraktandır (9,10).

Çalışmamızda, uygulanan DFO ve BMP-2'nin distaksiyon osteogenezi üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlandı. Bu nedenle,

oluşturulan deneysel distraksiyon modeli kullanılarak DFO ve BMP-2' nin etkileri mekanik ve histopatolojik olarak incelendi.

I.Ekstremite Uzatılması ve Distraksiyon Osteogenezi

Distraksiyon osteogenezinin modern anlamda ilk çalışmaları Codivilla tarafından diafizer osteotomi ile iskelet traksiyonu kullanarak femoral uzatma tekniğini uygulaması ile başlamıştır (11). Deneysel ilk çalışmayı ise Magnuson köpekler üzerinde uygulamıştır (12). Wagner (13,14) ise hastaların erken mobilize oldukları unilateral fiksator kullanımı tekniğini 1970 'lerde geliştirmiştir. De Bastiani (15) kallotazis adını verdiği teknikte monolateral dinamik fiksator kullanarak metafizyel osteotomi sonrası uzatma gerçekleştirmiştir. 1950'lerde ise Ilizarov kirschner telleri ile kemiği tespit ederek sirküler fiksator uygulamıştır (16). Ilizarovun G. (17,18) çalışmaları ile kemik defektlerinin, ekstremitte kısalıklarının ve deformitelerin tedavisinde önemli yeri olan distraksiyon osteogenezinin biyolojik temelleri ortaya konulmuştur.

Distraksiyon osteogenezi ekstremiteler arası uzunluk farkı olan hastalarda başarılı bir tedavi yöntemidir. Bu eşitsizliğin nedenleri arasında; iskelet displazisi, tümör, enfeksiyon ve travma gösterilebilir. Başarılı bir tedavi yöntemi olmasına rağmen pin dibi enfeksiyonu, eklem kontraktürleri, pin gevşemesi, geçikmiş konsolidasyon ve kırık gibi komplikasyonları da bulunmaktadır .

Distraksiyon osteogenezi latent dönem, distraksiyon dönemi ve konsolidasyon dönemi olmak üzere 3 ana fazdan oluşur (19-20). Latent dönem osteotomiyi takiben hemen başlar ve aktif distraksiyona kadar devam eder. Kırık iyileşmesinin erken dönemine benzer iyileşme dokusu oluşur, primer inflamasyon mekanizmaları tamamlanmıştır. Distraksiyon döneminde oluşan kallus üzerine germe kuvvetleri uygulanır, kallus gerildikçe fibröz bir ara bölge oluşur. Kondrosit ve fibroblastlardan zengin bu bölgede farklılaşmış osteoblastlar osteoid olarak birikir ve mineral kristalizasyonuna

uğrayarak mikrokolon zonunu oluşturur. Fibröz ve mikrokolon zonları arasında primer matriks görülür ve istenilen uzunluk elde edildiğinde distraksiyon sonlandırılır (21-22). Konsolidasyon dönemi ise distraksiyondan sonra oluşan rejeneratın olgunlaştığı dönemdir. Distraksiyon osteogenezisi sırasında kallus üzerindeki longitudinal gerginliğe bağlı olarak, canlı dokular yavaş ve istikrarlı bir traksiyona maruz kalırlar. Gerilen kallus dokusunda oluşan metabolik aktivasyona mekanotransduksiyon fenomeni adı verilir. Oluşan mekanik stress kemik yapımı için indüksiyon sağlar (23).

Distraksiyon osteogenezisinin başarısı birçok faktöre bağlıdır. Bunlar arasında en önemlileri osteotominin seviyesi, uzatma hızı, uzatma ritmi, latent dönemde bekleme süresi ve kullanılacak olan fiksatörün nitelikleridir (24-25).

Metafizler ve diyafizler osteotomilerin karşılaştırıldığı deneysel ve klinik çalışmalarda metafizler osteotomilerin iyileşme hızı ve potansiyelinin diyafizler osteotomilere göre daha iyi olduğu gözlenmiştir. Yapılan klinik ve deneysel çalışmalarda uygun günlük uzatma hızının 0,35 mm ile 1,4 mm arasında olduğu belirlenmiştir. Ilizarov (23) ve Delloye (26) en uygun uzatma miktarının günlük 1mm olduğunu ve bunun bir gün içinde 4 eşit uzatmaya bölünerek yapılması gerektiğini belirtmişlerdir. Günlük uzatma miktarının artırılması sonucu, yeni kemik yapımı engellenir, kaslarda atrofi, skleroz, nekroz ve kontraktürler gelişir, eklemlerde subluksasyon ya da dislokasyon görülebilir (27).

Kawamura'nın (28,29) nutrisyonel arterleri korumaya yönelik olarak kortikotomi önermiş olmasına rağmen yapılan son çalışmalarda kortikomi ya da periostun korunduğu kapalı osteotomiler arasında fark olmadığı, önemli olanın nutrisyonel arterlerin gelişimi için yeterli bekleme süresi olduğu belirtilmiştir. Yapılan deneysel çalışmalarda transvers osteotomi sonrası endosteal dolaşımın gelişimi için 10 günlük bekleme süresinin yeterli olduğu belirtilmiştir (30). Osteotomi sonrası uygun bekleme süresi klinik uygulamalarda 7-10 gündür (31-32). Bu süre hastanın yaşı ve kemiğin niteliği gibi faktörlere göre değişiklik gösterebilir (24).

Distraksiyon sırasında yeni oluşan kemiğe Ilizrov tarafından rejenerat ismi verilmiştir (33,). Uzatma sırasında intramembranöz ve enkondral olmak üzere iki tip yeni kemik oluşumu gerçekleşir. . İntramembranöz kemikleşme anjiogenezle ilişkili olmayan bir mekanizma ile yassı kemiklerin oluşumunda gerçekleşir (42). Enkondral kemikleşme ise kırık iyileşmesinde görülen ve embriyogenezis sırasında uzun kemiklerin oluşumundan sorumlu olan mekanizmadır. Distraksiyon osteogenezisinde baskın olan kemikleşme tipi intramembranöz kemikleşmedir (34). Distraksiyon osteogenezisinin latent döneminde osteotomi hattı hematoma ve inflamatuvar hücrelerden oluşur (35). Distraksiyon başladıktan sonra fibrovasküler bir köprü, distraksiyondogrultusunda organize olur. Distraksiyonun 1. haftasında ara bölge avaskülerdir, kollajen lifleri ve fibroblastlardan oluşur. İkinci haftada ilk osteoblast hücre kümeleri görülür, 3. haftada ise kemik trabeküllerinin organize olması ve ara bölgenin ossifikasyonu gerçekleşir.

Distraksiyon osteogenezisinde oluşan rejeneratın kalitesini etkileyen olumsuz faktörlerde vardır. Bunlardan bazıları; sigara kullanımı, radyoterapi, kematerapötik ajan kullanımı ve proteinden fakir diyet olarak belirtilmiştir (36,37,38,39).

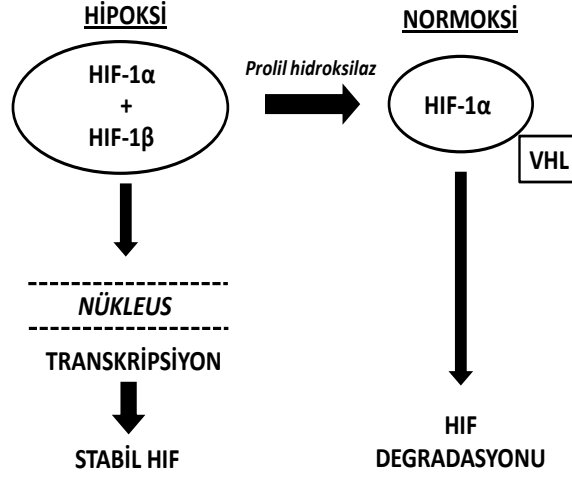
DeneySEL distraksiyon osteogenezis çalışmalarında, yeni oluşan kemiğin mekanik özellikleri, torsiyon, germe ve eğilme kuvvetlerine karşı olan direncine göre değerlendirilebilir (40,41).

II. Desferoksamin ve HIF-1' in Stabilizasyonu

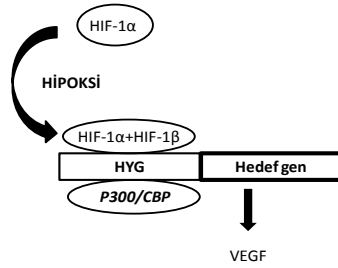
HIF, düşük oksijen basıncına yanıt verebilen $\alpha\beta$ heterodimerik transkripsiyon faktörüdür (43,44). HIF-1, HIF-2 ve HIF 3 olmak üzere hipoksi ile indüklenebilir 3 tip faktör tanımlanmıştır (45). HIF-1 ve HIF-2 hipoksik koşullarda fonksiyon gösteren benzer özelliklere sahiptir. HIF-3 ise bu iki tipe benzerlik göstermez ve anjiogenezis üzerine etkisi kanıtlanamamıştır (46). HIF-1, heliks yapısındaki HIF-1 α ve HIF-1 β proteinlerinin birleşmesi ile

oluşur (47). HIF-1'in etkisini ortaya çıkarabilmesi için p300 bağlayan proteine ihtiyaç duyar (48). HIF-1 aktivitesi ortamdaki oksijen düzeyi ile belirlenir (49). HIF-1 aktivitesi için iki tip oksijen sensörü mevcuttur. Bunlardan birincisi prolil hidroksilaz (PHD) , diğeri ise asparjin hidroksilazdır (FIH, HIF-1'i inhibe eden faktör) (50,51). Her iki enzimde oksijen basıncının normal olduğu durumlarda aktive olur. Prolil hidroksilaz (PHD) aktivasyonu sonucu von Hippel-Lindau proteininin etkisi ile HIF inaktif hale gelir (şekil-1). FIH tarafından gerçekleşen hidroksilasyon sonrası ise HIF ile p300 arasındaki ilişki bozulur ve HIF -1 fonksiyonu azalır (51). Hipoksik hücre ortamında HIF-1 α , HIF-1 β ile birleşir ve HIF -1 yapısı oluşur. HIF -1 nukleusa transloke olur ve hipoksiye yanıt veren gen bölgesini uyarır. Sonuç olarak HIF stabilize olur ve anjiogenezis için gerekli gen bölgesini aktif hale getirir (Şekil-2).

HIF-1 tarafından düzenlenen 100'ün üzerinde gen tanımlanmış olup VEGF hipoksi tarafından etkin hale geldiği en iyi bilinen proanjiojenik faktördür. VEGF kemik dahil birçok dokunun anjiogenezinde kritik bir role sahiptir (52). VEGF ailesi VEGF-A , VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve plasental büyüme faktörünü içerir (53). VEGF diğer büyüme faktörlerini uyarır ve hücre çoğalmasını, dayanıklılığı ve göçünü sağlar. Aynı zamanda damar geçirgenliğini düzenler ve vasküler tüplerin oluşumuna yol açar.



Şekil-1: Hipoksi ile indüklenbilir faktör stabilizasyonu (50)



Şekil-2: HIF stabilizasyonu sonucu hedef gen uyarılması ve VEGF salınımı (52).

Hipoksi vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörünün (VEGFR) ekspresyonunu düzenler. Çözünebilir formda olan bu reseptör VEGF etkisi ortaya çıktığında inhibe olur (54). VEGFR-2, VEGF bağlanmasını gerçekleştiren ana mediatördür ve tirozinler ile reseptör dimerizasyonu ve otofosforilasyonu sağlayarak endotel hücre göçünü, farklılaşmasını ve çoğalmasını sağlar (55).

Embriyonik dönemdeki iskelet gelişimi sırasında perikondriumun vaskülarizasyonu olmadan avasküler kıkırdakta vasküler invazyon gerçekleşmez. Gelişmekte olan iskelette oluşan mezenşimal dokular VEGF üzerinden hipertrofik kıkırdakta damar invazyonunu gerçekleştirir ve primer ossifikasyon merkezleri oluşur (56,57).

HIF-1 α ve VEGF anjiogenezi uyarmadan kemik hücre fonksiyonunu etkiler (58). HIF-1 α oksijen basıncının düşük olduğu büyüme plağı merkezinde apoptozisi indükler fakat periferdeki kondrositler daha büyük bir hızla çoğalır. Bu veriler HIF-1 α 'nın doğrudan kondrosit proliferasyonunu sağladığını göstermektedir (59).

In vitro çalışmalarda değişken oksijen seviyelerinde osteoblast fonksiyonları arasında tezat sonuçlar elde edilmiştir (60,61,62,63). VEGF osteoblastların farklılaşmasını sağlar ve Osteoblast ve osteoklast hücrelerinde VEGF ve reseptörlerinin ekspresyonunun mümkün olduğu gösterilmiştir (64).

Yara iyileşmesi ve yeni doku oluşumunda endotel hücre kemotaksisi önemli bir role sahiptir. VEGF endotel hücreleri için önemli bir kemoatraktan maddedir (65,66,67). PHD proteinleri oksidatif enzim ailesine dahil olup, enzimatik aktivitesi için Fe^{+2} 'ye kofaktör olarak bağlı olan moleküler oksijene ihtiyaç duyar (68). İnsanda üç tip PHD (PHD-1,PHD-2,PHD-3) bulunur. Bunlar içinde PHD-2 normoksi sırasında HIF-1 α 'nın düzenlenmesinden daha fazla sorumludur (69).

DFO demir toksisitesi ve hemokromatozis gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan bir demir şelatörüdür (70). Gleadale ve arkadaşları desferoksamin'in hipoksik koşullarda pro-anjiogenik maddelerin ekspresyonunu sağladığını göstermiştir (71). Demir şelatörleri indirek etkisi

ile normoksik koşullarda PHD2 ve FIH-1'i inhibe ederek HIF-1 a aktivitesini stabilize eder (72,73). Birçok klinik çalışmada DFO' in serebral, kardiyak ve ekstremite iskemilerinde doku iyileştirici rolü gösterildi (74,75). İlk olarak Clemens ve arkadaşları DFO' nun kırık iyileşmesi üzerine etkisini belgelemiştir (76). DFO, HIF stabilizasyonu yaparak VEGF oluşumunu artırır , oluşan VEGF ise kırık iyileşmesi sırasında yeni damar oluşumunu sağlamaktadır (70,76).

III. Bone morfojenik protein-2

Bone morfojenik protein transforming growth factor β (TGF β) ailesine ait bir polipeptittir (77). BMP' ler kendi içinde farklı gruplara ayrılır. BMP-2 ve BMP-4 homolog olanlardır. Diğer grup ise BMP-5 , BMP-6, BMP-7 ve BMP-8'den oluşur (77). BMP'nin kemik gelişiminde rolü olduğu gösterilmiştir aynı zamanda BMP'ler çeşitli organların gelişimi ve farklılaşmasında rol oynayan pleiotropik büyüme faktörüdür (78).

Osteoblast farklılaşması TGF β , insülin benzeri büyüme faktörü ve BMP gibi büyüme faktörleri tarafından düzenlenir (79). Yapılan in vivo çalışmaları, BMP-2' nin kemik rejenerasyonu ve kemik yeniden şekillenmesinde etkili olduğunu göstermiştir (80,81). In vitro çalışmaları BMP-2' nin osteoblastlarda farklılaşma belirteçlerinin (osteokalsin, alkalen fosfotaz) ve mineralize kemik nodüllerinin ekspresyonunu arttırdığını göstermiştir (82,83).

BMP distraksiyon osteogenezisinde kemik rejenerasyonu ve yeniden şekillenmesinde önemli bir role sahiptir (84,85). BMP'ler en güçlü osteoindüktif faktörlerden kabul edilmektedir. Bu ailede en güçlü etkiye BMP-2 sahiptir (86). Distraksiyon osteogenezisinde kemik rejenerasyonu ve konsolidasyonu süreçlerinde önemli bir rol oynar (87). Yapılan çalışmaları distraksiyon osteogenezisinde BMP-2'nin uzun kemiklerde konsolidasyon safhasını geliştirdiğini göstermiştir (88). Yapılan bir çalışmada osteotomi hattına emilebilen kollajen bir sünger ile yerleştirilen BMP-2' nin doza bağımlı şekilde kemik yenilenmesini arttırdığı gösterilmiştir (89).

Bone morfojenik proteinler sadece kemik oluşumunu arttırmaz yapılan in vivo çalışmalarda anjiogenezisi de arttırdığı gösterilmiştir (90). BMP-2, VEGF-A salınımını uyarır, VEGF-A ise osteoblastik farklılaşmayı uyarır (91). BMP kırık iyileşmesinde anjiogenezisi stimüle eder. BMP osteoblast kaynaklı VEGF-A salınımını uyararak anjiogenezisi arttırır (92,93).



GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Uludağ üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu' nun 29.09.2015 tarih ve 2015-11/03 numaralı etik kurulu kararı ile onaylanmıştır. Bu çalışmada yapılan histolojik ve immünohistokimyasal incelemeler Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilimdalı laboratuvarında, mekanik incelemeler Orhangazi Üniversitesi Makina Mühendisliği bölümünde gerçekleştirildi.

Deneyde, Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme, Uygulama ve Araştırma Merkezi' nden temin edilen, ağırlıkları 1500-2000 gr arasında değişen 24 adet Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı. Tavşanlar her birinde 8 adet olmak üzere rastgele üç gruba ayrıldı. Gruplardaki tavşanların sağ tibia diyafizlerine osteotomi yapılarak mini eksternal fiksator uygulandı. Her iki gruptaki tavşanlara 7 günlük latent dönemi takiben 15 gün boyunca düşük frekansta olmak üzere(günde iki kez) 0,3 mm distraksiyon yapıldı. BMP-2 grubunun osteotomi bölgesine, BMP-2 scaffold, cerrahi sırasında bir kez uygulandı. DFO grubunun osteotomi bölgesine distraksiyon boyunca desferoksamin (Desferal®; NOVARTIS) 200 µM/300µL/gün uygulandı. Kontrol grubunda osteotomi bölgesine cerrahi dışında herhangi bir uygulama yapılmadı. Deneyin 23. gününde uzatma sonlandırıldı. On beş günlük konsolidasyon dönemini takiben tavşanlar 38. günde sakrifiye edilerek tibiadaki rejenerat mekanik, histolojik ve immünohistokimyasal olarak incelendi.

I.Cerrahi teknik

Anestezi amacıyla %2'lik ksilazin hidroklorür (Rompun, Bayer healthcare) 14mg/kg ve ketamin hidroklorür (Ketalar, Pfizer) 80 mg/kg dozda farklı şırıngalardan kas içi uygulandı. Sağ alt ekstremitte ameliyat sahası %10 povidin iyot (Battikon; Adeka) solüsyonu kullanılarak temizlendi ve steril

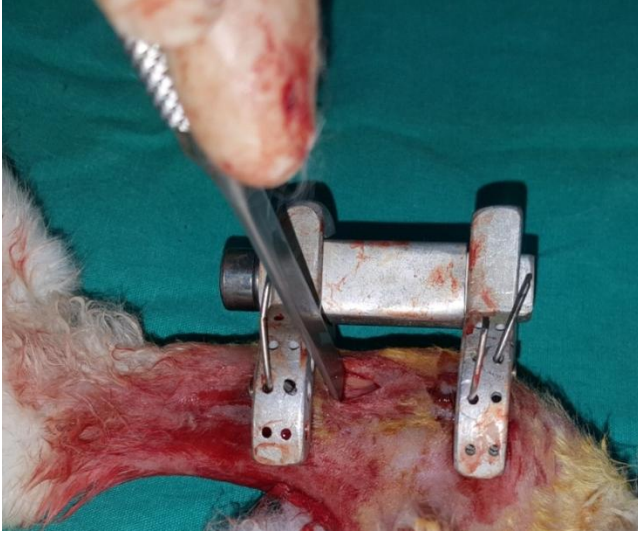
olarak örtüldü. Sağ tibia proksimal ve distal metafizlerine 1mm çapında ikişer adet pin perkütan olarak yerleştirildi. Proksimal ve distaldeki pinler ilizarat fiksatora tespit edildi (Şekil-3). Tibia proksimal diyafizine longitudinal cilt kesisi ile ulaşılarak osteotom ile transvers osteotomi yapıldı (Şekil-4). Aynı kesi kullanılarak bu seviyede fibulaya transvers osteotomi yapıldı. Serum fizyolojik ile osteotomi hattı yıkandı, cilt 4/0 emilmeyen naylon monofilaman dikiş ile (Ethilon) kapatıldı. Cerrahi sonrasında bağımsız kafes aktivitesine bırakılan tavşanların içme sularına analjezi amacıyla 100 ml' lik 2-3 mg/kg/gün dozunda parasetamol konuldu. Hayvanlar standart yem ile beslendiler, pin ve kesi bölgelerine günlük pansuman yapıldı.

II. BMP-2 hazırlanışı

BMP grubunda 2.5 mikrogram Bone Morphogenic protein-2 (Recombinant human BMP2 protein; Genscript) salin ile karıştırılarak 50 mikrolitrelik volüm elde edildi. Hazırlanan BMP-2 salin karışımı emilebilen hemostatik jelatin süngere (Spongostan) emdirildi. Hazırlanan scaffold osteotomi hattına yerleştirildi ve osteotomi hattı dikilerek kapatıldı (Şekil 5-6).



Şekil-3: Ekstremiteye eksternal fiksator uygulanması



Şekil-4: Tibiaya osteotomi uygulanması



Şekil-5: Bone morfojenik protein-2 scaffoldu



Şekil-6: Bone morfojenik protein-2 scaffoldun osteotomi hattına yerleştirilmesi

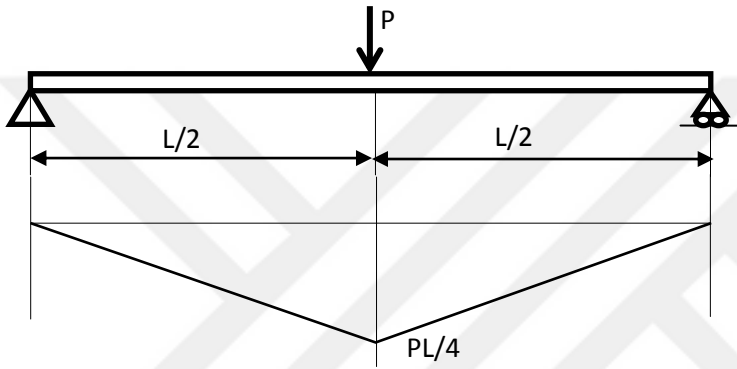
III. Mekanik test

Deney sonunda tibia diz ve ayak bileği eklemleri bir bütün olarak çıkarıldı ve kas dokularından sıyrıldı. Hazırlanan kemiklerde mekanik değerlendirme için üç nokta eğilme testi uygulandı. Üç nokta eğilme testinde deney numunesine bir kuvvet etkilediğinde, numune kesitinin bir kısmında basma gerilmesi, kesitin geri kalan kısmında çekme gerilmesi meydana geliyorsa numune eğilme halindedir. Eğilme halindeki numunelerin kesitinde, iç yüzeye yakın bölgede basma gerilmeleri, dış yüzeye yakın bölgede ise çekme gerilmeleri meydana gelmektedir. Bu yöntemlerde ana gaye, malzemeyi çatlatıncaya kadar tek yönde eğmektir.

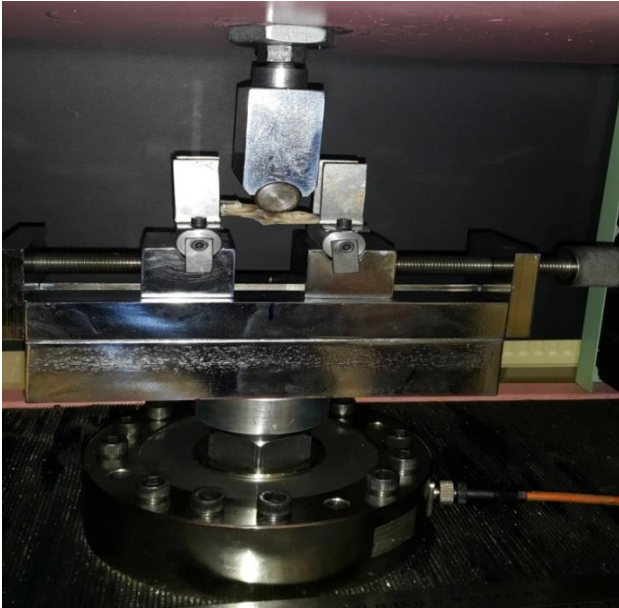
Üç nokta eğilme testinde L uzaklığında iki klemp arasına yerleştirilen numunenin orta noktasından P kuvveti uygulandı (Şekil-7) . Yapılan testde kuvvet ve orta noktanın çökme miktarı ölçüldü. Mekanik düzenek şematik olarak şekil 7’de gösterilmiştir. Çalışmamızda test edilen kemik; kuvvet, eğilme momenti, rijidite ve çökme açısından değerlendirildi. Bunun için kullanılan aşağıdaki denklemde δ ; orta noktanın çökme miktarını, P;

uygulananan kuvveti, L ; iki klemp arası mesafeyi, EI ; numunenin rijitlik değerini ifade eder.

$$\delta = \frac{PL^3}{48EI}$$



Şekil 7: Üç nokta eğilme testi



Şekil 8: Üç nokta eğilme testi uygulaması

IV. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Histopatolojik inceleme için her üç gruba ait distraksiyon bölgesini içeren örneklerin %10' luk formaldehit solüsyonunda fiksasyonu sağlandı. Takiben %10' luk formik asit solüsyonu içinde dekalsifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Örnekler dehidrasyonu takiben parafin bloklara gömüldü. Rutin takip işlemleri sonrası 4 µm lik kesitler alınarak hematoxilen-eosin (HE) ile boyanıp incelendiler. Histopatolojik değerlendirmede HE boyalı kesitlerde endokondral ve intramembranöz kemikleşmenin varlığı, iyileşme bölgesindeki damarlanmanın durumu ve yeni oluşan kemik trabeküllerinin özellikleri incelendi. Angiogenezi değerlendirmek için immünohistokimyasal boyama tekniği ile örnekler VEGF boyaması uygulandı. İmmünohistokimyasal boyama VEGF (Rabbit polyclonal VEGF, Anti-VEGF; Abcam; England) antikoru ile Leica Bond-Max otomatik immünohistokimya boyama cihazında polimer DAB kit kullanılarak yapıldı. İmmünohistokimyasal değerlendirme semikantitatif olarak yapıldı. Her üç grubun distraksiyon alanındaki fibroblast benzeri hücreler, osteoblastlar ve immatür osteositlerdeki boyanma dikkate alındı. Hiçbir hücrede boyanma yoksa 0, %1-25 oranındaki hücrede pozitif boyanma varsa 1, %26-50 oranındaki hücrede pozitif boyanma varsa 2, %50'nin üzerindeki hücrede pozitif boyanma varsa 3 olarak skorlandı. Bu skora göre boyanma yoğunluğu olarak 0 negatif, 1 hafif, 2 orta ve 3 kuvvetli pozitiflik olarak yorumlandı.

Her üç grupta HE boyalı kesitlerde intramembranöz ossifikasyon kalitesi değerlendirildi. Distraksiyon alanındaki sayıca artmış, iyi gelişmiş, çevrelerinde aktif osteoblastik zincir bulunan, birbirleriyle anastomozlaşarak bir kemik ağı oluşturan ve genelde kırık hattına uzunlamasına yönlenecek immatür kemik trabeküllerinin varlığı ossifikasyonun yeterli olduğu yönünde değerlendirildi. Bu trabeküllerin arasında konjesyone görümlü bol damar yapısı içeren genç bağ dokusu vardı. Bu görünümün aksine sayıca az, düzensiz ve gelişigüzel yerleşmiş kemik trabeküllerinin izlendiği olgularda intramembranöz ossifikasyon yetersiz olarak değerlendirildi.

Değerlendirmede intramembranöz ossifikasyon yanında endokondral ossifikasyon ve periosteal yeni kemik varlığı da dikkate alındı.

III. İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin tanımlayıcı istatistiklerinde ortalama, standart sapma, medyan en düşük, en yüksek, frekans ve oran değerleri kullanılmıştır. Değişkenlerin dağılımı Kolmogorov-Smirnov testi ile ölçüldü. Nicel verilerin analizinde Kruskal-Wallis, Mann-Whitney u testi ve bağımsız örneklem t testi kullanıldı. Nitel verilerin analizinde ki-kare testi, ki-kare test koşulları sağlanmadığında Fischer testi kullanıldı. İstatistiksel işlemler SPSS 22.0 programında yapıldı.

BULGULAR

Verilen lokal DFO ve BMP-2' ye karşı deneklerde herhangi bir yan etki gözlemlenmedi. Pin bölgesi enfeksiyonu tespit edilen kontrol ve DFO grubundaki iki tavşan günlük yara bakımı ile takip edildi.

I.Mekanik inceleme sonuçları

Üç nokta eğilme testi ile yapılan incelemelerde BMP-2 Grubunda kuvvet DFO ve Kontrol Grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. DFO ve Kontrol Grupları arasında kuvvet açısından belirgin fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). (Tablo1-2) (şekil-9)

Üç nokta eğilme testi ile yapılan incelemelerde BMP-2 Grubunda eğilme momenti DFO ve Kontrol Grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. DFO ve Kontrol Grupları arasında eğilme momenti açısından belirgin fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). (Tablo1-2) (şekil-10)

Üç nokta eğilme testi ile yapılan incelemelerde çökme miktarı BMP-2 ve DFO Gruplarında daha yüksek olmasına rağmen her üç Grup arasında çökme miktarı açısından belirgin fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). (Tablo1-2) (Şekil-11)

Üç nokta eğilme testi ile yapılan incelemelerde rijidite değeri Kontrol Grubunda DFO ve BMP-2 Grubuna göre daha yüksek olarak bulunmuştur. Her üç grup arasında rijidite açısından belirgin fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). (Tablo1-2) (şekil-12)

II.Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Değerlendirme sonuçları

HE ile yapılan incelemelerde intramembranöz kemik oluşumu BMP-2 Grubunda 3 denekte yeterli, 1 denek'te yetersiz, DFO Grubunda 2 denekte yeterli, 2 denekte yetersiz, Kontrol Grubunda 2 denekte yeterli, 2 denekte yetersizdi. Üç grup arasında intramembranöz ossifikasyon açısından belirgin fark bulunmamıştır ($p > 0.05$) (tablo 3-5) (şekil 14-17-18-23-24).

HE ile yapılan incelemelerde endokondral kemik oluşumu DFO Grubunda 3 denekte yeterli, 1 denekte yetersiz , BMP-2 Grubunda 2 denekte yeterli, 2 denekte yetersiz , Kontrol Grubunda 1 denekte yeterli, 3 denekte yetersizdi. Üç grup arasında endokondral Ossifikasyon açısından belirgin fark bulunmamıştır ($p > 0.05$) (tablo 3-5) (şekil 16-20-21).

HE ile yapılan incelemelerde üç grup arasında periosteal yeni kemik yapımı miktarı açısından belirgin fark bulunmamıştır ($p > 0.05$) (tablo3-5) (şekil 15).

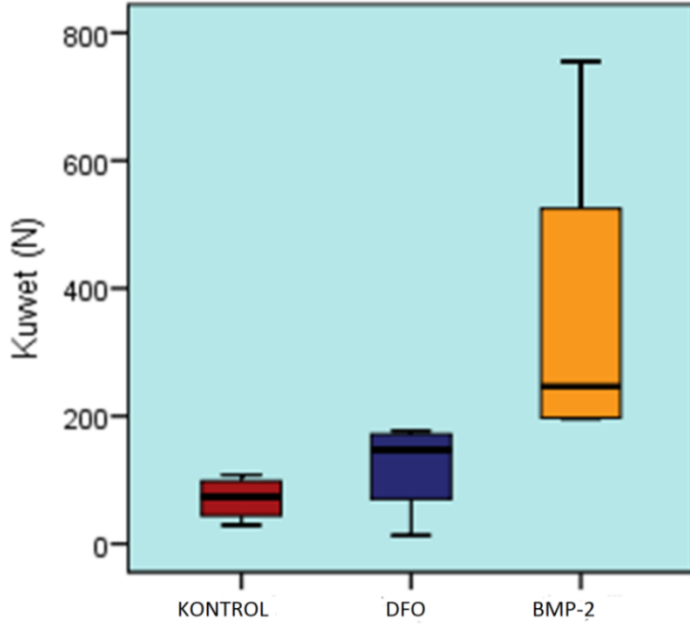
VEGF skoru DFO Grubunda BMP-2 Grubuna göre daha yüksek , her iki deney grubunda Kontrol Grubuna göre daha yüksek bulunmasına rağmen bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildi ($p > 0.05$) (tablo 3-4) (şekil 13-19-22-25).

Tablo-1: Üç nokta eğilme testi sonuçlarının gruplara göre dağılımı

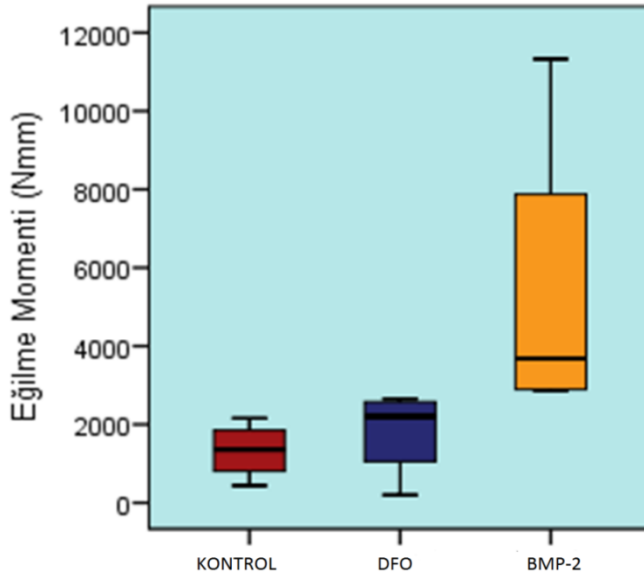
ÜÇ NOKTA EĞİLME TESTİ				
Numune Adı	Kuvvet (N)	EğilmeMomenti (Nmm)	Çökme (mm)	Rijidite (Nmm²)
Kontrol-1	107,91	2158,20	4,36	264181,78
Kontrol-2	58,86	1177,20	5,62	111715,30
Kontrol-3	88,29	1545,08	15,13	41696,23
Kontrol-4	29,43	441,45	30,89	4287,31
Ortalma	71,12	1330,45	14	105470,15
Dfo-1	127,53	1912,95	6,11	93894,80
Dfo-2	176,58	2648,70	6,62	120068,00
Dfo-3	166,77	2501,55	22,10	33957,69
Dfo-4	13,24	198,54	107,91	551,96
Ortalama	121,03	1815,43	35,68	62118,11
Bmp-1	294,30	4414,50	12,95	102282,21
Bmp-2	196,20	2943,00	26,87	32855,76
Bmp-3	755,37	11330,55	33,17	102477,09
Bmp-4	198,20	2846,10	28,47	35645,83
Ortalama	361,01	5383,53	25,36	68315,22

Tablo-2: Üç nokta eğilme testi sonuçları

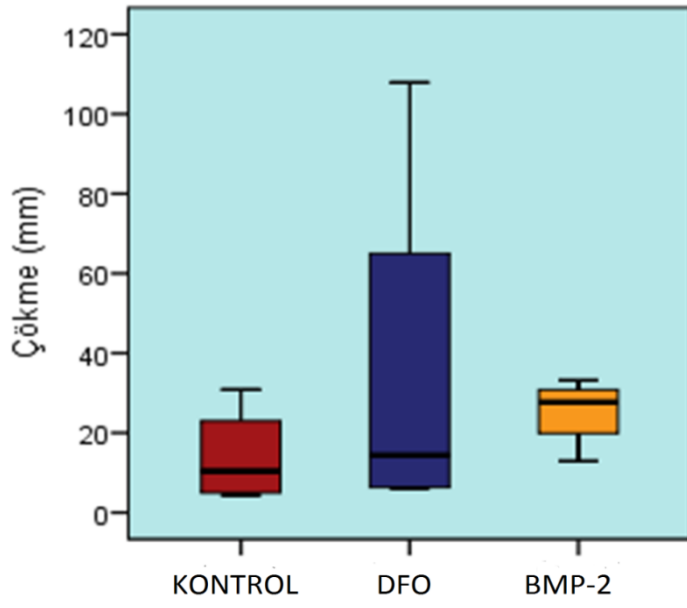
		Kontrol	DFO	BMP-2	p
Kuvvet (N)	Ort.±s.s.	71 ± 34	121 ± 75	361 ± 267	0.018
	Med(Min-Mak)	29 - 108	13 - 177	196 - 755	
Eğilme Momenti (Nmm)	Ort.±s.s.	1,3 ± 0,7	1,8 ± 1,1	5,4 ± 4,0	0.021
	Med(Min-Mak)	0,4 - 2,2	0,2 - 2,6	2,8 - 11,3	
Çökme (mm)	Ort.±s.s.	14,0 ± 12,2	35,7 ± 48,7	25,4 ± 8,7	0.390
	Med(Min-Mak)	4 - 31	6 - 108	13 - 33	
Rijitlik (Nmm²) (x10³)	Ort.±s.s.	105 ± 115	62 ± 55	68 ± 39	0.779
	Med(Min-Mak)	4 - 264	1 - 120	33 - 102	



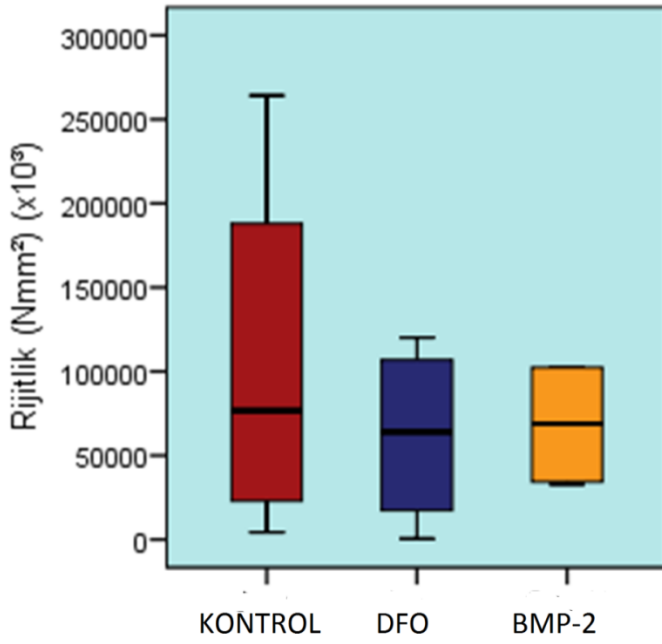
Şekil 9: Grupların kuvvet ölçüm sonuçları



Şekil 10: Grupların eğilme momenti ölçüm sonuçları



Şekil 11: Grupların çökme ölçüm sonuçları



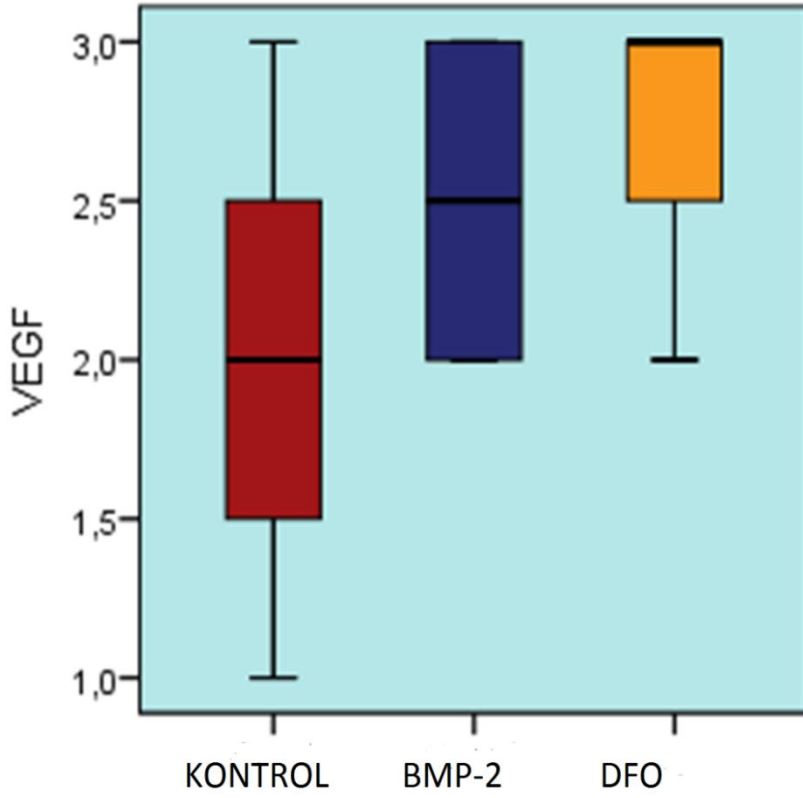
Şekil 12: Grupların rijidite ölçüm sonuçları

Tablo 3: Grupların Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal değerlendirme sonuçları

Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Değerlendirme sonuçları				
	İntramembranöz ossifikasyon	Endokondral ossifikasyon	Periosteal yeni kemik yapımı	VEGF SKORU
Kontrol-1	yeterli	yeterli	yetersiz	1
Kontrol-2	yetersiz	yetersiz	yetersiz	3
Kontrol-3	yetersiz	yetersiz	yeterli	2
Kontrol-4	yeterli	yetersiz	yeterli	2
Dfo-1	yeterli	yeterli	yetersiz	3
Dfo-2	yeterli	yeterli	yeterli	2
Dfo-3	yetersiz	yeterli	yeterli	3
Dfo-4	yetersiz	yetersiz	yetersiz	3
Bmp-1	yeterli	yeterli	yeterli	3
Bmp-2	yeterli	yetersiz	yetersiz	2
Bmp-3	yetersiz	yetersiz	yetersiz	3
Bmp-4	yeterli	yeterli	yetersiz	2

Tablo-4: Grupların ortalama VEGF skorları

		Kontrol	DFO	BMP-2	p
VEGF	Ort.±s.s.	2,0 ± 0,8	2,5 ± 0,6	2,8 ± 0,5	0.306
	Med(Min-Mak)	2 1 - 3	3 2 - 3	3 2 - 3	

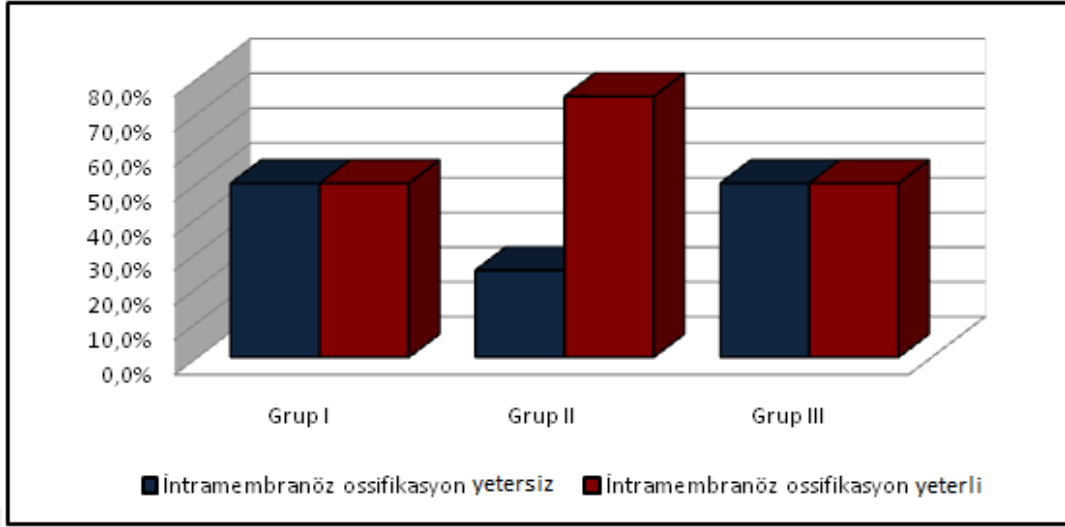


Şekil 13: Grupların VEGF skorları

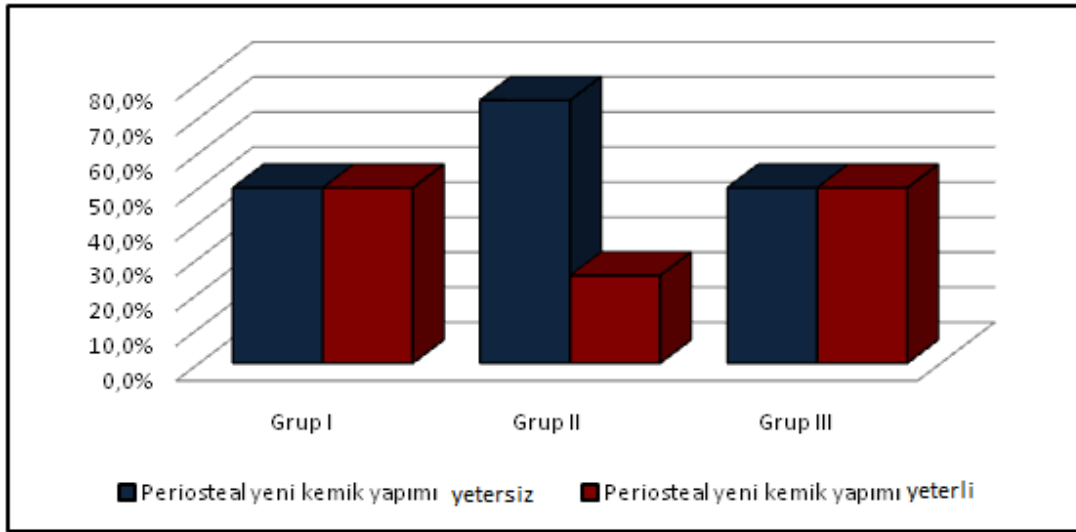
Tablo-5: Grupların histopatolojik değerlendirme sonuçları

	KONTROL		BMP-2		DFO		p
	n	%	n	%	n	%	
Endokondral Ossifikasyon							
Yetersiz	3	75,0%	2	50,0%	1	25,0%	χ^2 p > 0.05
Yeterli	1	25,0%	2	50,0%	3	75,0%	
Periosteal yeni kemik yapımı							
Yetersiz	2	50,0%	3	75,0%	2	50,0%	χ^2 p > 0.05
Yeterli	2	50,0%	1	25,0%	2	50,0%	
İntramembranöz ossifikasyon							
Yetersiz	2	50,0%	1	25,0%	2	50,0%	χ^2 p > 0.05
Yeterli	2	50,0%	3	75,0%	2	50,0%	

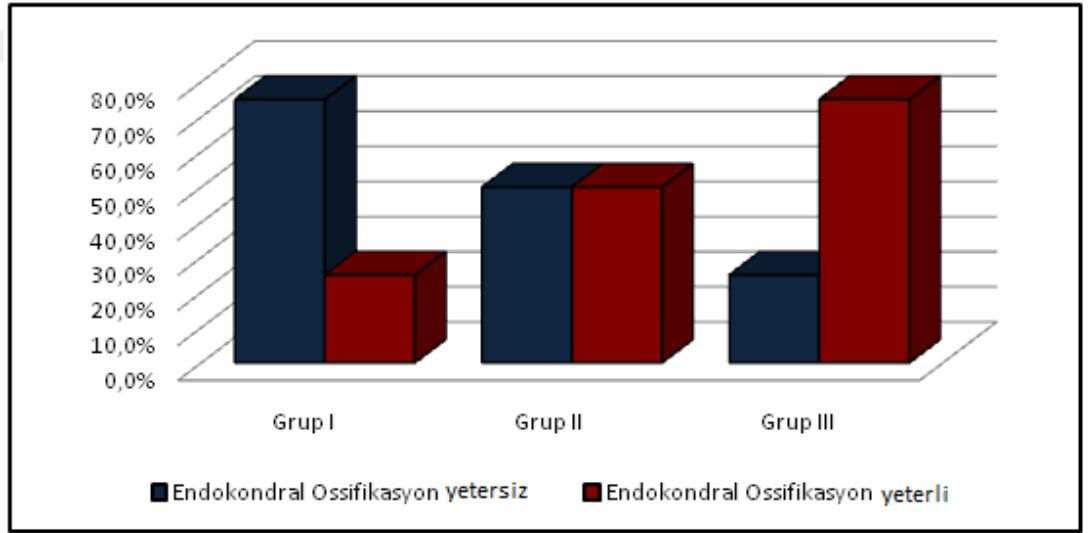
χ^2 Ki-kare test



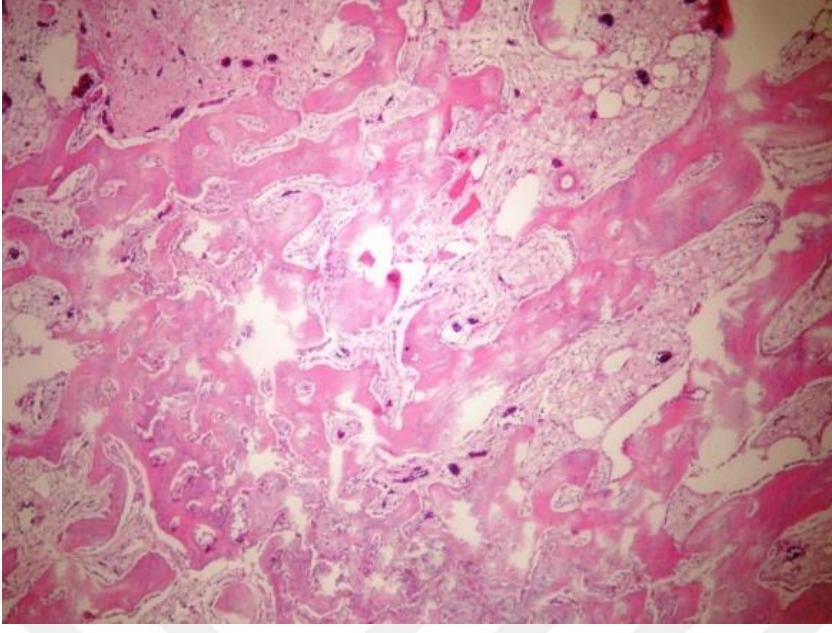
Şekil 14: Grupların intramembranöz ossifikasyon değerlendirilmesi (Grup 1: kontrol, Grup 2: BMP-2, Grup 3: DFO)



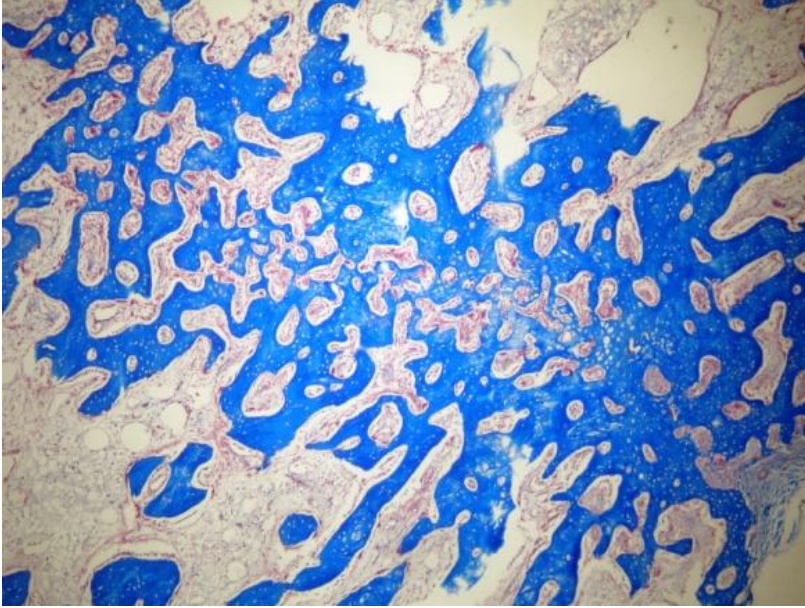
Şekil 15: Grupların periosteal kemik yapımı değerlendirilmesi (Grup 1: kontrol, Grup 2: BMP-2, Grup 3: DFO)



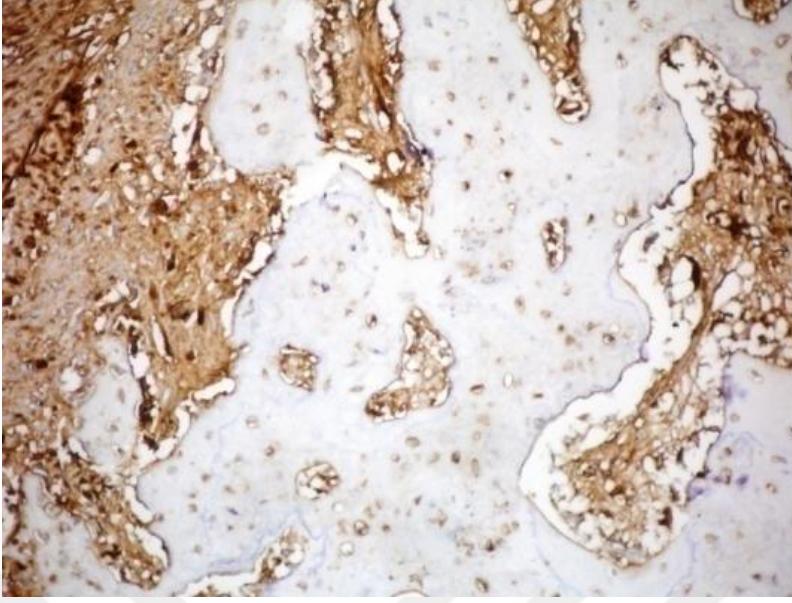
Şekil 16: Grupların endokondral ossifikasyon değerlendirmesi (Grup 1: kontrol, Grup 2: BMP-2, Grup 3: DFO)



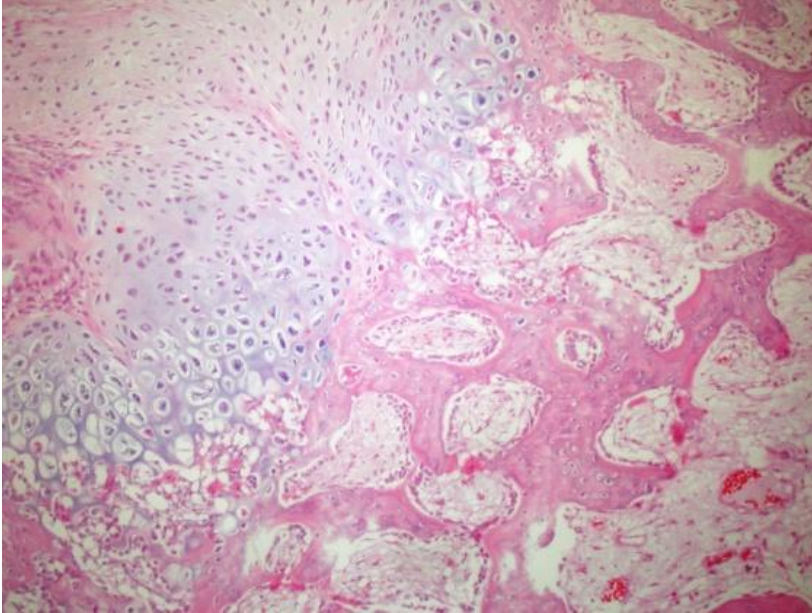
Şekil 17: Kontrol grubunda intramembranöz kemikleşme. Mezenşimde yer yer birbirine paralel dizilmiş, çevrelerinde osteoblastik zincirin izlendiği reaktif yeni kemik trabekülleri izlenmektedir (HEX100).



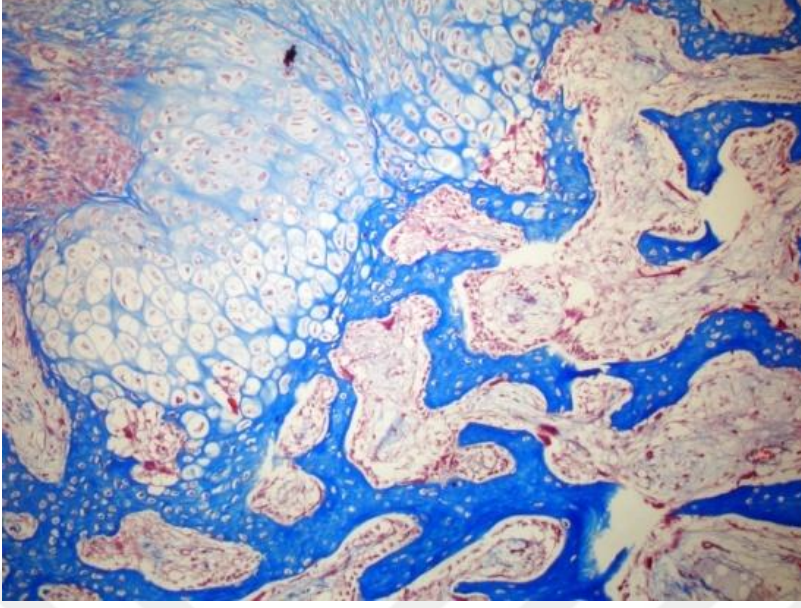
Şekil18: Kontrol grubunda intramembranöz kemikleşme. Masson's Trikrom boyamada mavi ile boyanmış reaktif yeni kemik trabekülleri izlenmektedir (Masson's TrikromX100).



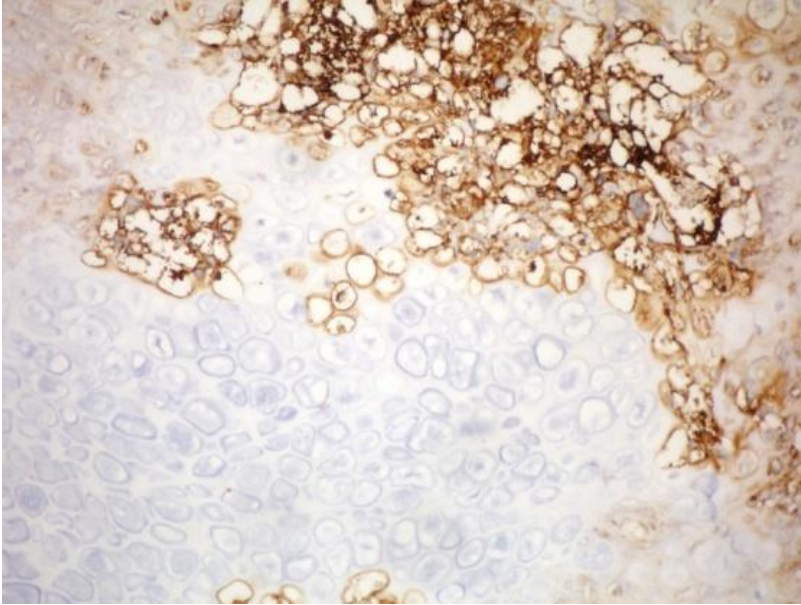
Şekil 19: Kontrol grubunda kemik trabeküllerindeki osteositlerde ve çevre mezenşimal hücrelerde VEGF ile immünreaktivitenin değerlendirilmesi (VEGFX200).



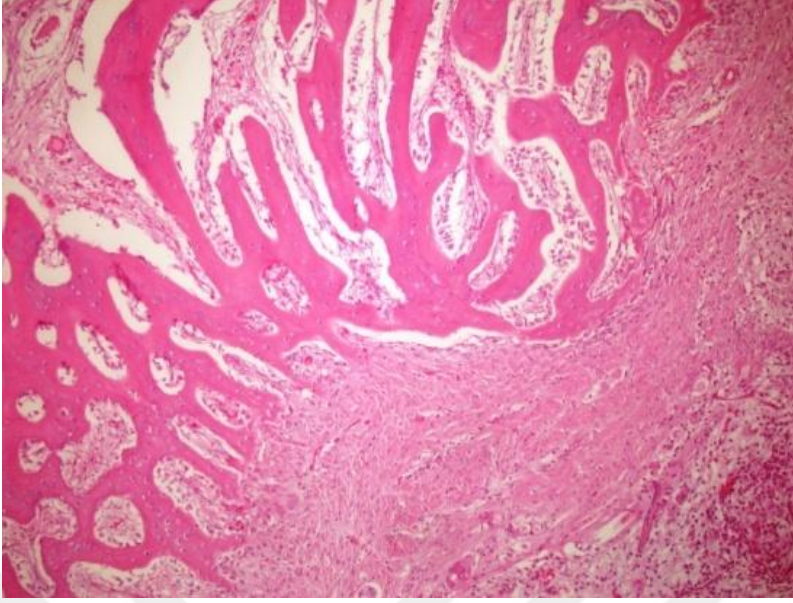
Şekil 20: BMP grubunda endokondral kemikleşme. Hücreden zengin kondroid dokudan gelişen çevrelerinde osteoblastik zincirin izlendiği reaktif yeni kemik trabekülleri izlenmektedir (HEX100).



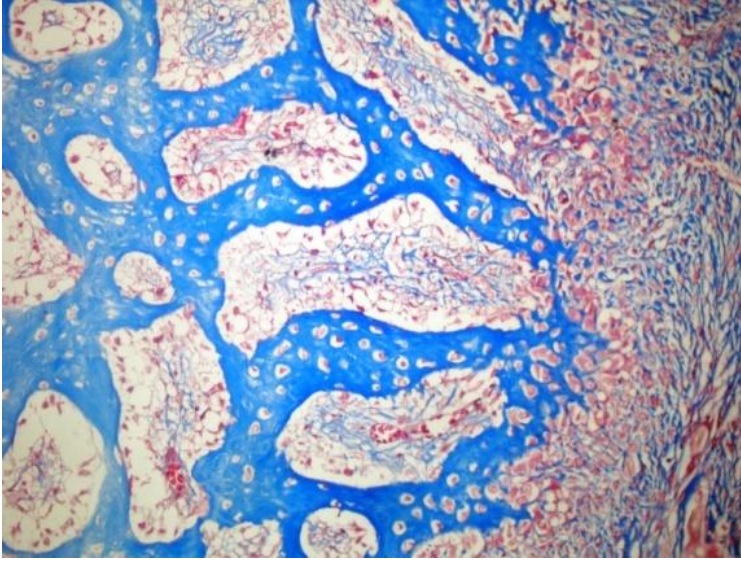
Şekil 21:BMP grubunda endokondral kemikleşme. Masson's Trikrom boyamada mavi ile boyanmış reaktif yeni kemik trabekülleri ve kondroid doku izlenmektedir (Masson's TrikromX100).



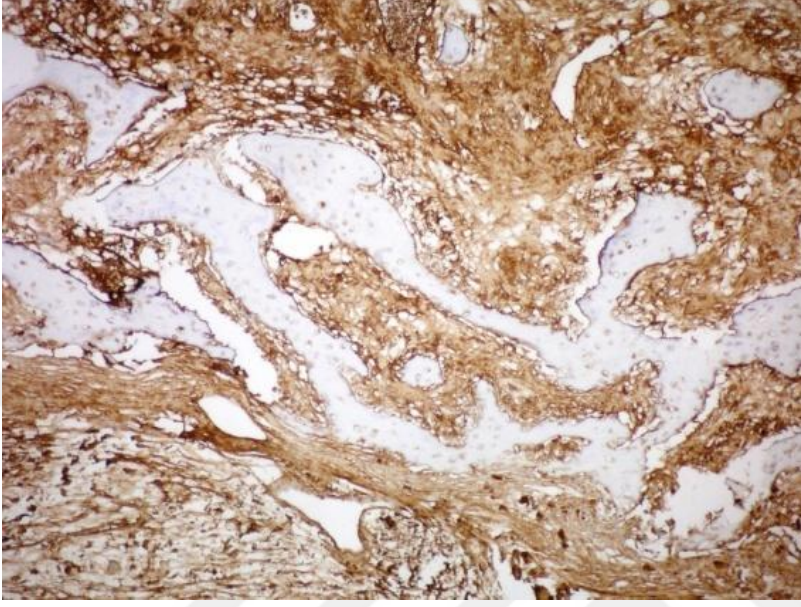
Şekil 22: BMP grubunda kondrositlerde, osteositlerde ve çevre mezenşimal hücrelerde VEGF ile immünreaktivite değerlendirilmesi (VEGFX200).



Şekil 23: DFO grubunda intramembranöz kemikleşme. Mezenşimde yer yer birbirine paralel dizilenmiş, çevrelerinde osteoblastik zincirin izlendiği reaktif yeni kemik trabekülleri ve sol alt köşede inflamatuvar hücreler izlenmektedir (HEX100).



Şekil 24: DFO grubunda intramembranöz kemikleşme. Masson's Trikrom boyamada mavi ile boyanmış reaktif yeni kemik trabekülleri izlenmektedir (Masson's TrikromX200).



Şekil 25: DFO grubunda kemik trabeküllerindeki osteositlerde ve çevre mezenşimal hücrelerde VEGF ile immünreaktivite değerlendirilmesi. (VEGFX100).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda, tavşan distraksiyon osteogenezis modelinde, lokal yolla kullanılan DFO ve BMP 2' nin VEGF aktivitesi ve yeni kemik yapımı üzerindeki etkinliği değerlendirildi.

HIF aracılı yollar kemik gelişimi, hemeostazı ve yenilenmesinde önemli bir role sahiptir. Hipoksik koşullarda HIF-1 α aktivasyonu sonucu osteoklast ve osteoblast farklılaşması gerçekleşir ve güçlü anjiyojenik etki oluşur. Wang ve ark. 1993 yılında HIF-1 α aktivasyonunun bir demir şelatörü olan DFO ile artacağını ilk kez göstermişlerdir (42) . Desferoksamin, PHD2 ve FIH-1 inhibisyonu yaparak HIF stabilizasyonuna ve bu yolla VEGF gen ekspresyonu artışına yol açar. Bir çalışmada sıçanlarda distraksiyon osteogenezisi modelinde lokal uygulanan DFO'nun mikroanjiyografik incelemede damar sayısını %40 daha fazla arttırdığı tespit edilmiştir (94). Diğer bir DFO uygulanan çalışmada femur kırığı oluşturulan sıçanlarda vaskülaritenin ve kallus formasyonunun arttığı tespit edilmiştir (95).

BMP-2 osteoblast kaynaklı VEGF-A yapımını ve dolayısıyla anjiogenezisi uyararak osteoblast farklılaşmasını uyarır. BMP-2 uygulamasından 24 saat sonra primer osteoblastlarda VEGF-A mRNA sentezini artırır ve protein sentezini uyararak VEGF-A üretimini artırır (96). Yapılan birçok çalışmada, kırık modellerinde BMP-2'nin anjiogenez üzerine olumlu etkisi belirtilmiştir (97-98). Martine M ve ark. (99), Bone morfojenik protein-2 uygulamasının osteoblast kaynaklı VEGF-A üretimini artırarak anjiogenezini uyardığını belirtmiştir. İn vivo anjiogenez modellerinde kornea örneklerinde ve civciv koryoallantoik membran deneylerinde bone morfojenik proteinin anjiogenezisi uyardığı görülmüştür (100-101).

DFO ve BMP-2 daha önce distraksiyon osteogenezisi modellerinde kullanılmış ve anjiogenezisi arttırdığı görülmüştür. Çalışmamızda, lokal uygulanan her iki etkeni karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı fark

saptanmamasına rağmen her iki grubun VEGF skorunun kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu görülmüştür. İki grup kendi arasında karşılaştırıldığında ise bir HIF stabilizatörü olan DFO' in VEGF skorunun BMP- 2' ye göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. VEGF skorlarının yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı sonuç alınamamasının denek sayısının yetersizliğine bağlı olduğu düşünülmüştür.

Gerber ve ark. VEGF reseptör blokörü kullandıkları bir çalışmada neoanjiogenezisin inhibe olduğu ve trabeküler kemik oluşumunun azaldığını belirtmişlerdir(102). Street ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, sıçanlarda oluşturulan kırık modellerinde VEGF inhibisyonu sonucu anjiogenezis, kallus mineralizasyonu ve yeni kemik oluşumu dramatik olarak düşmüştür (103). DFO ve BMP-2, VEGF salınımını artırarak distraksiyon osteogenezisinde anjiogenezisi ve yeni kemik oluşumunu arttırmaktadır.

BMP-2 mezenkimal kök hücrelerden yeni kemik ve kırıkta yapıyı indükleyerek yeni kemik oluşumuna önemli katkıda bulunur. BMP-2' nin lokal kullanıldığı bir çalışmada distraksiyon osteogenezisinde yeni kemik oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir (104).

DO ile ekstremitelere uzatılmasında biyomekanik etkenlerin sonuca yansımaları önemlidir. Başlıca biyomekanik etkenler sırası ile, uzatmaya başlamadan önce geçirilen süre (latensi) , uzatma sırasında uygulanan distraksiyonun hızı ve ritmi ve uzatma sonrası oluşan rejeneratın olgun kemiğe dönüşmesi için geçirilen konsolidasyon süresinin uzunluğu olarak özetlenebilir. Anjiogenezis bu sürecin başından sonuna kadar önemli bir işlevi üstlenmektedir. Çalışmamızda 15 günlük bir konsolidasyon döneminin geçirilmesine ve yeni kemik oluşumunun artmasına rağmen istatistiksel olarak fark elde edilememesinin en önemli nedeninin günde iki kez 0,3 mm olmak üzere düşük frekansta distraksiyon uygulaması olduğu düşünülmüştür. Kemirgenlerde özellikle tavşanlarda uygulanacak distraksiyon osteogenezisinde, uzatmanın hızı ve ritmi ile ilgili çalışmalar yapılmış olmakla beraber, kesinleşmiş optimum değerlerden bahsetmek olanaklı değildir. Bununla beraber tavşanlarda ideal distraksiyon hızı 0,6- 1,3

mm/gün olarak kabul görmektedir (105). Yapılacak hızlı distraksiyon sonucu oluşan yeni kemik dokusuna güvenilmez. Hızlı distraksiyonda az miktarda kan damarına sahip zayıf granülasyon dokusu oluşur, azalmış osteoblast aktivitesi, kırıldak dokusu ve kistlerin varlığı distraksiyon aralığında kemik yapımını geciktirmekte, engellemekte ve sonuçta kaynamamaya yol açmaktadır (106). Distraksiyon osteogenezisinde uzatma hızı, yeterli yeni kemik oluşumunun sağlanabilmesi için optimum düzeyde olmalıdır. Tavşan tibiasında uygulanan bir DO modelinde, hızlı uzatmanın anjiogenezisi inhibe ettiği ve kemik oluşumunu bozduğu görülmüştür (107). Devamlı distraksiyon ve kesintili distraksiyonun tavşanlar üzerinde karşılaştırıldığı diğer bir çalışmada distraksiyon devamlılığının sabit bir mekanik stres yaratarak daha çok osteoid oluşumuna yol açtığı görülmüştür (108). Bu araştırmalar ile kıyaslandığında kemik oluşumunda istatistiksel fark saptanmamasının nedeninin, çalışmamızda günde iki kere olmak üzere kesintili bir ritm ile yapılmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda BMP-2 grubu ile DFO ve kontrol grubu arasında kuvvet ve eğilme momenti değerlerinde anlamlı fark saptanmıştır. En büyük kuvvet, en büyük eğilme momenti BMP-2 grubunda bulunmaktadır. Kontrol grubu numunelerin ortalama kuvvet değerleri en küçük seviyede çıkmıştır, ayrıca bu grupta kırılmadan önceki çökme miktarı da en düşük çıkmaktadır. Kontrol grubunun rijidite değeri en büyük ortalamaya sahiptir. Bütün bu sonuçlar kontrol grubu numunelerin mekanik olarak daha dayanıksız olduğunu göstermiştir. DFO grubu numunelerde rijidite değeri ortalaması en düşük seviyededir. DFO grubu numunelerinin elde edilen kuvvet değerleri ve çökme değerleri ortalaması kontrol grubu numunelerinin ortalama değerlerinden daha yüksektir. Bu sonuçlar, DFO grubu numunelerinin mekanik dayanıklılığının daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Çalışmadan elde edilen sonuçlar şu şekilde sıralanabilir:

1. DFO ve BMP -2, VEGF aktivitesini arttırarak anjiogenezisi uyarmaktadır.

2. Anjiogenezis yeni kemik oluşumunun başlatılması ve sürdürülmesi için en önemli mekanizmaların başında gelmekle beraber yetersiz biyomekanik koşullarda anjiogenezisin uyarılması ideal kemik oluşumu için yeterli değildir.

3. DFO ve BMP-2 anjiogenezisi arttırarak oluşan rejeneratın mekanik olarak daha dayanıklı olmasını sağlamaktadır.

Çalışmanın zayıf yönünün denek sayısının yetersiz olması düşünülmüştür.

Çalışmamızda elde edilen bulguların ışığında distraksiyon osteogenezisinde DFO ve BMP-2 kullanımının anjiogenezisi arttırdığı ve mekanik olarak dayanıklılık sağladığı saptanmıştır. Distraksiyon osteogenezisinde yeni kemik oluşumunun en temel taşlarından birisi anjiogenezisdir. Bu konudaki deneysel ve klinik çalışmaların artması ile DFO ve BMP-2 gibi anjiogenezisi arttıran etkenlerin distraksiyon osteogenezisi üzerindeki rolü daha net ortaya çıkacaktır.

KAYNAKLAR

1. Trueta J , Trias A. The vascular contribution to osteogenesis. The effect of pressure upon the epiphysial cartilage of the rabbit. J Bone joint Surg. 1961 ; 43: 800-13
2. Treta J, Buhr AJ. The vascular contrubition to osteogenesis. The vasculature supplying the epiphysal cartilage in rachitic rats . J Bone Joint Surg. 196; 45: 572-581.
3. Risau w. Mechanisms of angiogenesis. Nature 1997; 386, 671-4
4. Jain RK . molecular regulation of vessel maturation. Nat Med 2003;9:685-93
5. Maes C. Carmeliet G. and Scipani E. (2012) Hypoxia –driven pathways in bone development , regeneration and disease. Nature Rewiwvs rheumatology 8, 358-366
6. Riddle R.C, R Khatri, E Schipani et al. Role of hypoxia-inducible factor 1alpha in angiogenic-osteogenic coupling. Journal of molecular medicine 2009;87, 583-590.
7. Flagg S.C, CB Martin, CY Taabazuing et al. Screnning chelating inhibitors of HIF- prolyl hidroxylase domain 2 and factor inhibiting HIF. Journal of inorganic Biochemistry.2012;113, 25-30.
8. Cho E.A, HK Song, SH Lee, et al. Differential in vitro and cellular effects of iron chealtors for hopoxia inducible factor hydroxylases. Journal of cellular biochemistry 2013;114, 864-873.
9. Deckers MM van Bezooijen RL , van der Horst G, et al. Bone morphogenetic protein stimulate angiogenesis throught osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. Endocrinology 2002; 143: 1545-53
10. Raida M, Heymann AC, Niederwieser D. role of bone morphogenetic protein 2 in the crosstalk between endothelial progenitor cells and mesenchymal stem ceels. Int. J.Mol.Med.2006;18:735-9.
11. Wiedemann M. callus distraction: A New Method? Clinical orthop 1996; 327:291-304
12. Magnuson PB. Lengthening shortened bones of the leg by operation. Surg Gyneco Obstet 1913;17:63-71
13. Guarniero R. Femoral lengthening by the Wagner method. Clin orthop. 1990;250:154-159
14. Wagner H. Operative lengthening of the femur clin orthop 1978;136:125
15. De Bastiani G. limb lengthening by callus distraction Jpediatr orthop 1987;7:129

16. Ilizarov GA Transosseous osteosynthesis-theoretical and clinical aspect of regeneration and growth of tissu. Berlin springer-verloag 1992;137:257-260
17. Li G. new developments and insights learned from distraction osteogenesi. Curt opin orthop 2004;15:543-548
18. Wang X. Distraction osteogenesis in correction of micrognathia and obstructictive sleep apnea syendrom. Plast Reconstr Surg 2003;112:1549-1557
19. Isefuku S , Joyner CJ, Simpson AH. A murine model of distraction osteogenesis. Bone 2000 ;27:661-5
20. Aronson J, hogue WR, Flahiff CM, et al. Development of tensile strength during distraction osteogenesis in a rat model . J.orthopRes 2001;19:64-9
21. Vauhkonen M, peltonen J, Karaharju K, Alitalo I. Collagen synthesis and mineralization in the eraly phase of distraction bone healing. Bone miner 1990;10:171-81
22. Sato M, Yasui N, Nakase T, et. Al. Expression of bone matrix roteins m RNA during distraction osteogenesis. J Bone Miner . 1998;13:1221-31
23. Ilizarov GA. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. The influence of stability of fixation and soft tissue preservation. Clin Orthop Relat Res 1989;238:249-81
24. James A, Xinghu S. Experimental healing distraction osteogenesis comparing metaphyseal with diaphyseal sites. Clinical Orthop and Related Research. 1994;301:25-30
25. Marina R. Effect of rhythm and level of distraction on muscle structure. Cinical Orthop and Related Research. 2001;384:250-264.
26. Delloye C. Bone regenerate formation in cortical bone during distraction lengthening. Clinical Orthop 1990;250:34-37
27. Saleh M, Hamer AJ. Bifocal limp lengthening. J .Pediatr Orthop 1993;2:42-48
28. Kawamura B. Limb lengthening. Orthop Clin North Am 1989;9:155-169
29. Kawamura B. Limb lengthening by means of subcutaneous osteotomy. JBJS 1968;50:851-878
30. Kojimato H. Bone lengthening in rabbits by callus distraction. JBJS 1988;70 B:543-547
31. Sprul JT Ì Price CT. Recent advances in limp lengthening. Clinical advance. Orthop rev 1992;21:307-314
32. Paley D. Current technique in limb lengthening. J Pediatr Orthop 1988;8:73-75
33. Ilizarov GA. The tension stres effect on the genesis and growth of tissue. Part 2. The influence of the rate and frequency of distraction. Clin Orthop 1989;239:263-285

34. Natsuo Y, Motohiko S, Tomoatsu K. Three modes of ossification during distraction osteogenesis in the rat. British editorial society of bone and joint surgery. 1997;79B,no 5,824-830
35. Aranson J. The biology of distraction osteogenesis. Operative Orthopaedics, ed by Chapman. J-JB. Lippincott Company, Philadelphia.1993;p873-882
36. Stewe W. Bone healing of tibial lengthening is delayed by cigarette smoking: study of bone mineral density and torsional strength on rabbits. The journal of trauma injury. Infection and critical care. 1999;46:110-115
37. Tsuchiya H. Distraction osteogenesis after irradiation in a rabbit model: journal of orthop sci 1993;10:627-633
38. Subasi M. Effect of chemotherapeutic agents on distraction osteogenesis: arch orthop trauma surg 2001;121:417-421
39. Pollak D . the effect of protein malnutrition and nutritional support on the mechanical properties of fracture healing in the injured rat: JPEN J Parenter Enteral Nutr 1986;10(6):564-7
40. Harp JH, Aranson J, Hollis M. Mechanical forces as predictors of healing during tibial lengthening by distraction osteogenesis. Clinical orthop. And Related Research 1994;301:73-79
41. Orbay L, Frankel VH, Finkle FJ, et al. Canine leg lengthening by ilizarov technique. A biomechanical , radiologic study. Clinical Orthop and Related Research 1992;278:265-273
42. Wang Y, Wan C, Deng L, et. Al. The hypoxia inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. J Clin Invest 2007;117:1616-26
43. Maes, C., Carmeliet, G. and Schipani, E. Hypoxia-driven pathways in bone development, regeneration and disease. Nat Rev Rheumatol2012; 8(6), 358-66
44. Wang, G.L. and Semenza, G.L. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90(9), 4304-8
45. Gordan JD, Simon MC. Hypoxia inducible factors.: central regulators of the tumor phenotype. Curr opin genet dev 2007;17:71-7
46. Wiedeman A, Johnson RS. Biology of HIF-1. Cell death differ. 2008;15:621-7
47. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, et al. Hypoxia inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:5510-4
48. Kallio PJ, Okamoto K, O'brien S, et al. Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the HIF1-ALPHA. Embo J1998;17:6573-86

- 49.** Jaakkola, P, DR Mole, YM Tian, et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001;292(5516), 468-72
- 50.** Lando, D, DJ Peet, DA Whelan, et al. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 2002; 295(5556), 858-61
- 51.** Kallio, P.J, WJ Wilson, S O'Brien, et al. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 1999; 274(10), 6519- 25
- 52.** Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3:721–732. [PubMed:13130303]
- 53.** Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, et al. VEGF receptor signalling—in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006; 7:359–371. [PubMed: 16633338]
- 54.** Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of VEGF activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10705-9.
- 55.** Ferrara N, Gerber HP , Lecouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-76.
- 56.** Zelzer E, McLean W, Ng YS, et al. Skeletal defects in VEGF120/120 mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Development*. 2002; 129:1893–1904. [PubMed: 11934855]
- 57.** Colnot C, Lu C, Hu D, et al. Distinguishing the contributions of the perichondrium, cartilage, and vascular endothelium to skeletal development. *Dev Biol*. 2004; 269:55–69. [PubMed:15081357]
- 58.** Schipani E, Ryan HE, Didrickson S, et al. Hypoxia in cartilage:HIF-1 α is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev*. 2001; 15:2865–2876. [PubMed: 11691837]
- 59.** Zelzer E, Mamluk R, Ferrara N, Johnson RS, Schipani E, Olsen BR. VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development. *Development*. 2004; 131:2161–2171. [PubMed:15073147]
- 60.** Hirao, M, J Hashimoto, N Yamasaki et al. Oxygen tension is an important mediator of the transformation of osteoblasts to osteocytes. *J Bone Miner Metab* 2007; 25(5), 266-76
- 61.** Matsuda, N, N Morita, K Matsuda, et al. Proliferation and differentiation of human osteoblastic cells associated with differential activation of MAP kinases in response to epidermal growth factor, hypoxia, and mechanical stress in vitro *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 249(2), 350-4
- 62.** Genetos, D.C, CA Toupadakis, LF Raheja, et al. Hypoxia decreases sclerostin expression and increases Wnt signaling in osteoblasts. *J Cell Biochem* 2010; 110(2), 457-67

- 63.** Chen, D, Y Li, Z Zhou, et al. HIF-1alpha inhibits Wnt signaling pathway by activating Sost expression in osteoblasts. *PLoS One*2013; 8(6), e65940
- 64.** Tombran-Tink J, Brnstable CJ, Osteoblasts and osteoclasts Express PEDF, VEGF-A isoforms, and VEGF receptors: possible mediators of angiogenesis and matrix remodeling in the bone. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;316:573-9
- 65.** Grunewald M, Avraham I, Dor Y, et al. VEGF-induced adult neovascularization: Recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 2006;124:175-89
- 66.** Roodhart JM, Langenberg MH, Vermaat JS, et al. Late release of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells after chemotherapy predicts response and survival in cancer patients. *Neoplasia* 2010;12:87-94
- 67.** Li G, Cui Y, McIlmurray L, Allen WE, et al. RhBMP-2, rhVEGF 165, rhPTN and thrombin related peptide, tp508 induce chemotaxis of human osteoblasts and microvascular endothelial cells. *J Orthop Res* 2005;23:680-85
- 68.** Nagel, S, NP Talbot, J Mecinović, et al. Therapeutic manipulation of the HIF hydroxylases. *Antioxid Redox Signal*2010; 12(4), 481-501.
- 69.** Aprelikova, O, GVR, Chandramouli et al. Regulation of HIF prolyl hydroxylases by hypoxia-inducible factors. *J Cell Biochem*2004; 92(3), 491-501.
- 70.** Shen X, Wan C, Ramaswamy G, et al. Prolyl hydroxylase inhibitors increase neoangiogenesis and callus formation following femur fracture in mice. *Journal of orthopaedic research*. 2009; 27(10): 1298–1305. [PubMed: 19338032]
- 71.** Gleadle, J.M, BL Ebert, JD Firth, et al. Regulation of angiogenic growth factor expression by hypoxia, transition metals, and chelating agents. *Am J Physiol*1995; 268(6 Pt 1), C1362-8
- 72.** Flagg, S.C, CB Martin, CY Taabazuing, et al. Screening chelating inhibitors of HIF-prolyl hydroxylase domain 2 (PHD2) and factor inhibiting HIF (FIH). *J Inorg Biochem* 2012; 113, 25-30
- 73.** Cho, E.A, HK Song, SH Lee, et al. Differential in vitro and cellular effects of iron chelators for hypoxia inducible factor hydroxylases. *J Cell Biochem* 2013; 114(4), 864-73
- 74.** 78. Li, Y.X, SJ Ding, L Xiao, et al. Desferoxamine preconditioning protects against cerebral ischemia in rats by inducing expressions of hypoxia inducible factor 1 alpha and erythropoietin. *Neurosci Bull* 2008; 24(2), 89-95
- 75.** Chekanov, V.S, M Zargarian, I Baibekov, et al. Deferoxamine-fibrin accelerates angiogenesis in a rabbit model of peripheral ischemia. *Vasc Med* 2013; 8(3), 157-62

- 76.** Wan, C, SR Gilbert, Y Wang, et al. Activation of the hypoxia-inducible factor-1alpha pathway accelerates bone regeneration. *Proc Natl Acad Sci* 2008;65-73
- 77.** Ducky P, Karsenty G The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int* 2000; 57:2207–2214.
- 78.** Hogan BL . Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev*1996; 6:432–438
- 79.** Papachroni KK, Karatzas DN, Papavassiliou KA, et al. Mechanotransduction in osteoblast regulation and bone disease. *Trends Mol Med* 2009; 15: 208-216,
- 80.** Kirker-Head C, Karageorgiou V, Hofmann S, et al. sized femoral defects. *Bone* 2007; 41: 247-255,
- 81.** Kamiya N and Mishina Y: New insights on the roles of BMP signaling in bone-A review of recent mouse genetic studies *Biofactors* 37: 75-82, 2011.
- 82.** Mai Z, Peng Z, Wu S, et al. Single bout short duration fluid shear stress induces osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells via integrin β 1 and BMP2 signaling cross-talk. *PLoS One*2013; 8: e61600,
- 83.** Zamurovic N, Cappellen D, Rohner D , et al. Coordinated activation of notch, Wnt, and transforming growth factor-beta signaling pathways in bone morphogenetic protein 2-induced osteogenesis. Notch target gene Hey1 inhibits mineralization and Runx2 transcriptional activity. *J Biol Chem* 2004; 279: 37704-37715,
- 84.** Campisi P, Hamdy RC. Expression of bone morphogenetic proteins during mandibular distraction osteogenesis. *Plast Reconstr Surg* 2003;111(1):201–8. discussion 209–10.
- 85.** Hamdy RC, Amako M, Beckman L, Kawaguchi M, Rauch F, et al. Effects of osteogenic protein-1 on distraction osteogenesis in rabbits. *Bone* 2003;33(2):248–55.
- 86.** Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 1996;10(13):1580–94.
- 87.** Yazawa M, Kishi K, Nakajima H, et al. Expression of bone morphogenetic proteins during mandibular distraction osteogenesis in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg* 2003;61(5):587–92.
- 88.** Li G, Bouxsein ML, Luppen C, et al. Bone consolidation is enhanced by rhBMP-2 in a rabbit model of distraction osteogenesis. *J Orthop Res* 2002;20(4):779–88.
- 89.** Sailhan F, Gleyzolle B, Parot R, et al. Rh-BMP-2 in distraction osteogenesis: dose effect and premature consolidation. *Injury* 2009.
- 90.** Ripamonti U, Van Den Heever B, Sampath TK, et al. Complete regeneration of bone in the baboon by recombinant human osteogenic protein-1. *Growth Factors*1996; 13:273–289

- 91.** Deckers MML, Karperien M, van der Bent C, et al. Expression of vascular endothelial growth factors (VEGFs) and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology* 141:1667–1674
- 92.** Moutsatos IK, TurgemanG, Zhou S, et al. Exogenously regulated stem cell-mediated gene therapy for bone regeneration. *Mol Ther* 3:449–461
- 93.** Ripamonti U, Crooks J, Matsaba T, et al. Induction of endochondral bone formation by recombinant human transforming growth factor-2 in the baboon. *Growth Factors* 2000;17:269–285
- 94.** Donneys, A, AS Farberg. Deferoxamine enhances the vascular response of bone regeneration in mandibular distraction osteogenesis. *Plast Reconstr Surg* 2012;129(4), 850-6
- 95.** Xing Shen, Chao Wan, Girish Ramaswamy, et al. Prolyl Hydroxylase Inhibitors Increase Neoangiogenesis and Callus Formation following Femur Fracture in Mice. *J Orthop Res.* 2009 October ; 27(10): 1298–1305. doi:10.1002/jor.20886.
- 96.** KozawaO, MatsunoH, Uematsu T, et al. Involvement of p70 S6 kinase in bone morphogenetic protein signaling: vascular endothelial growth factor synthesis by bone morphogenetic protein-2 in osteoblasts. *J Cell Biochem* 2001;81:430–436
- 97.** Suwa F, Fang YR, Toda I, et al. SEM study on microvascular changes following implantation of bone morphogenetic protein combined with hydroxyapatite into experimental bone defects. *J Osaka Dent Univ* 1998;32:27–34
- 98.** Ripamonti U, Crooks J, Matsaba T, et al. Induction of endochondral bone formation by recombinant human transforming growth factor-2 in the baboon. *Growth Factors* 2000; 17:269–285
- 99.** Martine m. I. Deckers, Rutger I. et al. Bone Morphogenetic Proteins Stimulate Angiogenesis through Osteoblast-Derived Vascular Endothelial Growth Factor A *Endocrinology* 143(4):1545–1553
- 100.** Moutsatos IK, TurgemanG, Zhou S, et al. Exogenously regulated stem cell-mediated gene therapy for bone regeneration. *Mol Ther* 2001;3:449–461
- 101.** Yamashita H, Shimizu A, Kato M, et al. Growth/differentiation factor-5 induces angiogenesis in vivo. *Exp Cell Res* 1997; 235:218–226
- 102.** Gerber, H.P, TH Vu, AM Ryan, et al. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 1999;5(6), 623-8.
- 103.** Street, J, M Bao, S Bunting, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(15), 9656-61.

- 104.** Ashinoff RL, Cetrulo CL Jr, Galiano RD, et al. Bone morphogenetic protein-2 gene therapy for mandibular distraction osteogenesis. *Ann Plast Surg* 2004;52:585-90
- 105.** Li G, Simpson AH, Kenwright J, et al. Assessment of cell proliferation in regenerating bone during distraction osteogenesis at different distraction rates. *J Orthop Res* 1997;15(5):765–72
- 106.** Aronson J , Experimental and clinical experience with distraction osteogenesis. *Cleft Palate Craniofac J* 1994;31:473-82;481-48
- 107.** Li G , Simpson AH. Effect of lengthening rate on angiogenesis during distraction osteogenesis. *J Orthop Res* 1999;17:362-7.
- 108.** Djasim UM, Mathot BJ , Wolvius EB ,et al. Histomorphometric comparison between continuous and discontinuous osteogenesis. *J craniomaxillofac Surg* 2009;37:398-404



TEŞEKKÜR

Tez danışmanım sayın Prof. Dr. Bartu Sarısözen'e , uzmanlık eğitimimde emeiği geğen tüm Uludağ Üniversitesi Tıp Fakóltesi Ortopedi ve Travmatoloji AD öğretim üyelerine, birlikte çalıştığım araştırma görevlisi arkadaşlarıma, hayatım boyunca bana destek olan annem, babam, kardeşim ve sevgili eřim ile kızıma teşekkür ederim.



ÖZGEÇMİŞ

15.05.1985 tarihinde Nazilli'de doğdum. İlkokul öğrenimimi 24 kasım ilk öğretim okulunda, orta ve lise öğrenimimi Yusuf Kalkavan Anadolu lisesinde tamamladım. 2003 yılında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne başlayıp 2009 yılında Tıp Fakültesi'nden mezun oldum. Kahramanmaraş Kale sağlık ocağında ve Kahramanmaraş Yenişehir Devlet Hastanesinde acil servisinde 18 ay kadar pratisyen hekimlik görevinde bulundum. 2011 yılında başladığım Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji ihtisasını 2016 yılında tamamladım.