



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

**OSTEOBLASTLARDA PROLİFERATİF VE ANTİ-APOPTOTİK
ETKİLİ ADRENOMEDÜLLİN HORMONUNUN SEGMENTAL
KEMİK DEFEKTİ ÜZERİNE ETKİSİ**

DR. MEHMET KAYMAKOĞLU

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA

2020



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

**OSTEOBLASTLARDA ANTI-APOPTOTİK VE PROLİFERATİF
ETKİLİ ADRENOMEDÜLLİN HORMONUNUN SEGMENTAL
KEMİK DEFEKTİ ÜZERİNE ETKİSİ**

DR. MEHMET KAYMAKOĞLU

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**TEZ DANIŞMANI:
PROF. DR. EGEMEN TURHAN**

ANKARA

2020

TEŞEKKÜR

Başta Anabilim Dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. A. Mazhar TOKGÖZOĞLU olmak üzere uzmanlık eğitimi boyunca emeği geçen ve desteğini esirgemeyen öğretim üyesi tüm hocalarıma,

Tez danışmanım olan ve tez hazırlanması ve yazım sürecinde emeklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Egemen TURHAN'a,

5 yıl boyunca beraber çalıştığımız tüm Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı ailesi çalışanlarına ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Çalışmada en az benim kadar emeği geçen ve tek başıma asla yapamayacağım işlemlerde bana yardımcı olan, özverileri ve bilime meraklarıyla bana öğrenciliğimi hatırlatan Dr. Mehmet Ege ERDEN ve Dr. Hazal Yağmur YALÇIN'A ve tecrübesini ve boş vaktini benimle laboratuvarında hayvan deneyi yaparken paylaşan Uzm. Dr. Erdi ÖZDEMİR'E,

Çalışmanın histoloji ve sanal ortamdaki verilerini elde etmemizi sağlayan ve yoğun mesaisi içerisinde bana zaman ayırıp, yol gösteren Sayın Prof. Dr. Petek KORKUSUZ, Uzm. Eda Çiftçi DEDE'YE ve Dr. Sefa Burak ÇAM'a,

Küçük bir çocukken, o ders çalıştığında yanında defter karalayarak örnek almaya başladığım, doktorluk ne kadar özveri ve çalışma gerektirse de aynı zamanda harika bir baba ve hoca olmayı başaran babam Prof. Dr. Sabahattin KAYMAKOĞLU'NA, en zor zamanlarımda karşılıksız sevgisi ve sıcaklığıyla bana kol kanat geren ve beni büyüten annem Aylin KAYMAKOĞLU'NA ve küçükken yaramazlıklarına katlanmak zorunda kalan, kendi çizdiği yolda yapmak istediklerini tek tek yapmayı başaran sevgili kardeşim Elif KAYMAKOĞLU'NA,

Asistanlık dönemimde yoğunluktan bazen ona zaman ayıramasam da beni en çok anlayan kişi ve hayat arkadaşım olan sevgili eşim Dr. Gülçin KAYMAKOĞLU'NA,

Ufkumun ve kişiliğimin gelişmesinde hayatımdaki en önemli yer olduğunu düşündüğüm, ülkemizin en nitelikli beyinlerinin yetiştiği yerlerden biri olan, okulum, İSTANBUL ERKEK LİSESİ CAMİASI VE ARKADAŞLARIMA,

Sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

ÖZET

Kaymakoğlu M., Osteoblastlarda Anti-Apoptotik ve Proliferatif Etkili Adrenomedüllin Hormonunun Segmental Kemik Defekti Üzerine Etkisi. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2020.

Kemik defektlerinin ortopedik tedavisi zorlu ve maliyetlidir. Bu alanda yapılan kemik defektli hayvan deneyleri pek çok molekül ve biyomateryalin kemik üzerine etkilerini araştırmak adına kullanılmaktadır. Son yıllarda bulunan ve henüz tam olarak etkileri bilinmeyen adrenomedüllin hormonunun literatürde kemik doku üzerine makroskopik ve hücresel düzeyde pozitif yönde etkilerinin bulunması nedeni ile segmental kemik defektinin iyileşmesine katkı yapıp yapmayacağını araştırmak üzere bir hayvan deneyi planladık. Toplam 36 adet Wistar rat ile 4-8 haftalık ve 15-30 µg'lık doz ve zaman bağımlı 6 grup oluşturuldu. Her grupta bilateral önkol radius cisminden 2 mm'lik defekt oluşturuldu ve haftalık 3 kere intraperitoneal olmak üzere 4 ve 8 haftalık kontrollere NaCl solüsyonu, 15 µg 4 hafta, 15 µg 8 hafta, 30 µg 4 hafta ve 30 µg 8 haftalık deney gruplarına belirtilen dozlarda adrenomedüllin uygulandı. Deneyin sonunda hayvanlara ötenazi uygulandı ve formolin solüsyonunda mikrotomografi ile defekt bölgesi görüntülendi. Mikrotomografik olarak kemik yüzey alanı, kemik hacmi, trabeküler kemik kalınlıklarına bakıldı ve ardından histolojik analize geçildi ve dekalsifikasyon sürecinin ardından ışık mikroskopunda defekt bölgesinde oluşan yeni kemik alanları bilgisayar ortamında hesaplandı ve istatistiksel olarak mikrotomografi ve histoloji verileri karşılaştırıldı. Mikrotomografide ve histolojide 15 µg lık gruplarda belli parametrelerde istatistiksel anlamlı daha fazla yeni kemik alanları olduğu görüldü. 30 µg lık gruplarda ise bu etki görülmedi. Kemik mineral yoğunluğunda ise adrenomedüllin verilen deney gruplarında, kontrol grubuna göre artış gözlemlendi.

Sonuç: Çalışmamızda, her ne kadar çoğu parametrede istatistiksel anlamlı bir fark çıkmasa da, adrenomedüllinin kemik dokunun hasar almış bölgelerinde belli dozlarda, kemik dokuya pozitif etki edebileceğine dair radyolojik ve histolojik sonuçlar mevcuttur. Ancak bu etki, defekt modelinde düşünüldüğü kadar büyük bir iyileşme ortaya çıkartmamıştır. Adrenomedüllin ve kalsitonin grubu hormonların kemik dokuya travma veya stres durumlarında nasıl etkilediği konusunda yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

ABSTRACT

Kaymakoglu M., The Effect of Adrenomedullin Hormone with Anti-Apoptotic and Proliferative Properties in Osteoblasts on Segmental Bone Defect. Hacettepe University Faculty of Medicine, Orthopaedics and Traumatology Department, Thesis, Ankara, 2020.

Orthopaedic treatment of bone defects is difficult and costly. Animal researches with bone defects are used to investigate the effects of many molecules and biomaterials. We planned an animal research to investigate the effect of adrenomedullin hormone, which has been found in recent years and whose effects are not yet fully understood, on bone defect. We tried to find an answer whether adrenomedullin hormone with its positive effects on bone tissue both at the macroscopic and cellular levels can contribute to the improvement of segmental bone defect. Time and dose dependent six groups were created with 36 Wistar rats. In each group, a 2 mm defect at the diaphysis of radius was created bilaterally. NaCl solution was administered to sham groups three times a week for 4 and 8 weeks, intraperitoneally. Adrenomedullin was administered to experiment groups three times a week; 15 µg 4 weeks, 15 µg 8 weeks, 30 µg 4 weeks and 30 µg 8 weeks. At the end of the experiment, the animals were euthanized and the defect site was visualized by microtomography in the formolin solution. After that, histological analysis was performed and new bone areas formed in defect area was measured via light microscope. Microtomographical and histological data between groups were compared using statistics. In microtomography and histology, it was observed that there were statistically significant in some of the parameters indicating new bone formation in 15 µg groups and bone mineral density was found higher in adrenomedullin groups.

Conclusion: In our study, although there is no statistically significant difference in most parameters, there are radiological and histological results that indicate adrenomedullin may have a positive effect on damaged bone tissue at certain doses. However, this effect did not reveal as great improvement in a bone defect model.

Further studies are needed on how adrenomedullin and calcitonin group hormones affect bone tissue in cases of trauma or stress.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER.....	vii
TABLolar	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Adrenomedüllerin.....	3
2.2. Kemiğin Genel Özellikleri	7
2.2.1. Kemiğin Yapısı	8
2.2.2. Kemik Hücreleri.....	9
2.2.3. Kemik Matriksi	10
2.2.4. Kemik Fizyolojisi.....	10
2.3. Kemik Defektleri.....	12
2.3.1. Kırık İyileşmesinin Fizyolojisi.....	12
2.3.2. Kemik Defekti Tanımı ve Fizyolojik Olarak Kırıktan Farkları	15
2.3.3. Segmental Kemik Defekt Modeli ve Kullanım Alanları.....	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. Cerrahi İşlem Tekniği	22
3.2. Cerrahi Sonrası Dönem.....	24
3.2.1. Radyolojik Görüntüleme ve Değerlendirme	25
3.2.2. Sanal Biyomekanik Değerlendirme	27
3.2.3. Histomorfometrik Değerlendirme	28
3.2.4. İstatistiksel Analiz.....	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. Radyografik Bulgular.....	31
4.2. Mikrotomografi Bulguları.....	33
4.3. Sanal Biyomekanik Bulgular	37
4.4. Histopatolojik Bulgular.....	37

5. TARTIŞMA	41
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	48
7. KAYNAKLAR	49

KISALTMALAR

AM	: Adrenomedüllin
CGRP	: <i>Calcitonin Gene Like Receptor</i> : Kalsitonin Gen İlişkili Peptid
CLR	: <i>Calcitonin Like Receptor</i> : Kalsitonin Benzeri Reseptör
RAMP	: Reseptör Aktivitesi Modifiye Edici Protein
CTR	: Calcitonin Receptor: Kalsitonin Reseptörü
PTH	: Parathormon
GH	: Büyüme hormonu
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
BMP	: <i>Bone Morphogenetic Factor</i>
M-CSF	: Monosit-Koloni Stimüle Edici Faktör
RANKL	: RANK ligandı
OPG	: Osteoprotegrin
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
IL	: İnterlökin
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
TGF	: <i>Trombocyte Growth Factor</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
µg	: Mikrogram
kV	: Kilovolt
µA	: Mikroamper
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
YKA	: Yeni Kemik Alanı
TDA	: Toplam Defekt
KH	: Kemik Hacmi
KY	: Kemik Yüzeyi
TbKa	: Trabeküler Kalınlık
KH/KY	: Kemik Hacmi/Kemik Yüzey Oranı
KHF	: Kemik Hacim Fraksiyonu
KMY	: Kemik Mineral Yoğunluğu
DEXA	: Dual Enerji X-ray Absorbsiyometri
HU	: Hounsfield Unitesi

ŞEKİLLER

- Şekil 2.1. Adrenomedüllin peptid yapısı.
- Şekil 2.2. Kalsitonin ailesine ait peptidler ve reseptörleri
- Şekil 2.3. Trabeküler ve kortikal kemiğin makroskopik yapısı.
- Şekil 2.4. RANK-RANKL ve osteoprotegrin ilişkisi
- Şekil 3.1. Supin pozisyonda cerrahi bölgenin traşlanıp hazırlanması
- Şekil 3.2. Önkol volar insizyon
- Şekil 3.3. Kerrison rounger (solda) ile kemik defekti yaratılması işlemi
- Şekil 3.4. Mikrotomografi cihazı.
- Şekil 3.5. Örneklerin mikrotomografi cihazı içinde tespiti
- Şekil 3.6. Defekt bölgesinin üç boyutlu olarak incelenmesi
- Şekil 3.7. Defekt bölgesinin kaynamasını ve kaynamamasını gösteren örnekler.
- Şekil 4.1. 15 µg 4 hafta grubunun radyografik görüntüleri
- Şekil 4.2. 15 µg 8 hafta grubunun radyografik görüntüleri
- Şekil 4.3. 30 µg 4 hafta grubunun radyografik görüntüleri
- Şekil 4.4. 30 µg 8 hafta grubunun radyografik görüntüleri
- Şekil 4.5. Kontrol-4 hafta grubunun radyografik görüntüleri
- Şekil 4.6. Kontrol-8 hafta grubunun radyografik görüntüleri
- Şekil 4.7. Kutu çizgi grafiklerinde, mikrotomografik kemik hacmi analiz sonuçları verilmektedir. Dikey ekseninde kemik hacmi, yatay ekseninde ise gruplar görülmektedir.
- Şekil 4.8. Kutu çizgi grafiklerinde, mikrotomografik kemik yüzeyi (B) analiz sonuçları verilmektedir. Dikey ekseninde kemik hacmi, yatay ekseninde ise gruplar görülmektedir.
- Şekil 4.9. Kutu çizgi grafiklerinde, kemik mineral yoğunluğu (KMY) analiz sonuçları verilmektedir. Dikey ekseninde kemik mineral yoğunluğu, yatay ekseninde ise gruplar görülmektedir.
- Şekil 4.10. Trabeküler kalınlık ile kemik hacmi korelasyon verilerinin birbiriyle olumlu korelasyon gösterdiği görülmektedir.

Şekil 4.11. Kemik yüzeyinin kemik hacmine oranı ile kemik hacminin birbiriyle olumlu korelasyon gösterdiği görülmektedir.

Şekil 4.12. Defekt bölgesinde kaynama ile iyileşme ve kaynamama görülen iki ayrı örneğin üç boyutlu mikrotomografi görüntüleri

Şekil 4.13. Kontrol ve deney gruplarına ait mikrograflarda defekt alanı

Şekil 4.14. Yeni kemik alanı/Toplam defekt alanı gruplar arası istatistiksel analizi.

Şekil 4.15. Yeni kemik alanının toplam defekt alanına oranı ile trabeküler kalınlık korelasyon verileri

TABLÖLAR

Tablo 2.1. Kemik defekt büyüklüklerine göre tedavi stratejileri.

Tablo 3.1. Deney grupları

Tablo 3.2. Lane ve Sandhu kemik defekti iyileşmesi değerlendirme kriterleri ve skorlama sistemi

Tablo 4.1. Lane ve Sandhu kriterlerine göre grupların defekt iyileşme puanları

1. GİRİŞ

Çalışmanın Amacı

Adrenomedüllin, ilk olarak 1993 yılında feokromasitomali bir hastadan izole edilen ve adrenal medulladan salgılanan 52 aminoasit uzunluğunda peptid bir hormondur [1]. Vücutta pek çok organdan salgılanan bu hormonun oldukça güçlü vazodilatatör ve hipotansif etkileri olması sebebiyle ilk zamanlarda vücutta kan basıncını regüle eden bir hormon olduğu bulunmuş ve daha sonra kalsitonin gen ailesi adı verilen ve kalsitonin, kalsitonin gen ilişkili peptid (Calcitonin-Gen-Related Peptide - CGRP) ve amilin peptid hormonlarının içinde olduğu, ortak bir aminoasit halka yapısına sahip bir hormon grubuna ait olduğu keşfedilmiştir [2]. Sepsis, kronik böbrek yetmezliği, konjestif kalp yetmezliği gibi vücutta sistemik stres yaratan durumlarda da adrenomedüllin hormonunun yükseldiği ve bir prognostik faktör olarak kullanılabileceği literatürde belirtilmiştir [3]. Kalsitonin ailesine dahil edilen adrenomedüllinin, osteoblastlar ve kemik doku üzerine yapılan çalışmalarda osteoblastlar üzerinde proliferatif ve anti-apoptotik etkileri olduğu ve kemik yoğunluğunu osteoporotik farelerde arttırdığı gösterilmiş ve bu etkiyi 52 aminoasitlik zincirinin 22-52 fragmanı üzerinden yaptığı, kalan 1-22 fragmanının ise vazoaaktif etkilerden sorumlu olduğu bulunmuştur [4].

Oldukça yeni keşfedilmiş bir hormon olarak adrenomedüllin hormonunun kırıkta veya kırık defektlerinde bir etkisinin olup olmadığı üzerine bir çalışma literatürde mevcut değildir. Osteoblastlarda direk reseptörleri bulunan ve kemik metabolizmasında da etkili olduğu keşfedilen bu hormonun osteoblastik aktivite veya kemik matriks oluşumu mekanizması üzerinden kırık defekti iyileşmesi üzerinde pozitif etkileri olacağı hipotezinden hareketle radiuslarında segmental kemik defekti oluşturduğumuz 6 gruptan oluşan sıçan deney modelinde zaman ve doz bağımlı olarak adrenomedüllinin segmental kemik defekti üzerinde etkilerini araştırdık.

Bu çalışmada kırık modeli yerine segmental kemik defekti kullanmamızın sebebi, sıçanların çok hızlı iyileşme kapasitesine sahip olmaları sebebi ile kırık modelinde gerek kontrol gerekse deney gruplarında kırığın çok yüksek oranda iyileşmesi ve gruplar arasındaki iyileşme farklılıklarını değerlendirmede yanlış

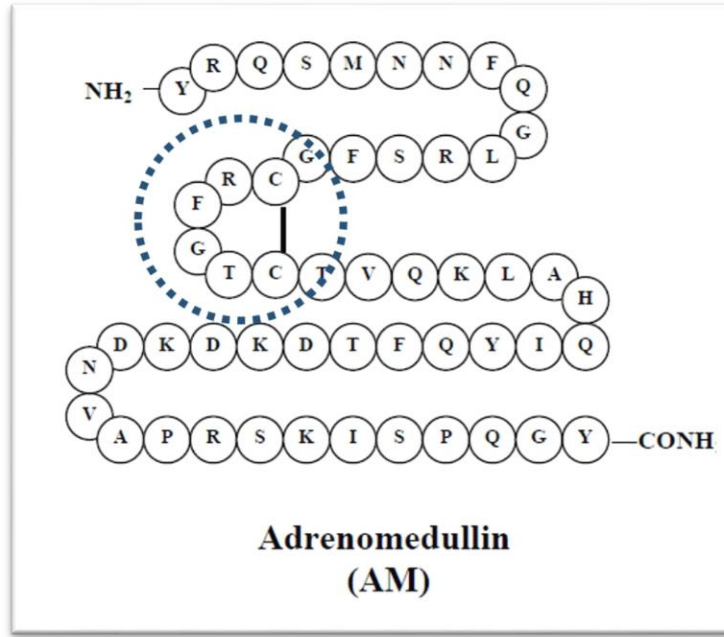
pozitifliğin fazla olmasıdır. Bu sebeple segmenter kemik defekti modeli ile kaynamama modeli oluşturup, adrenomedüllerinin kemik uçları arasındaki kaynama dokusunu indükleyip indüklenmediğini radyolojik ve histolojik olarak inceledik. Literatürde de segmental kemik defekti ile kemik matriks oluşumu, hücre proliferasyonu ve damarlanmayı incelemenin daha uygun olduğunu destekleyen yönde çalışmalar mevcuttur [5].

Çalışmanın sonucuna göre adrenomedüllerinin kemik üzerindeki etkilerini daha da aydınlatmayı amaçlamaktayız.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Adrenomedüllin

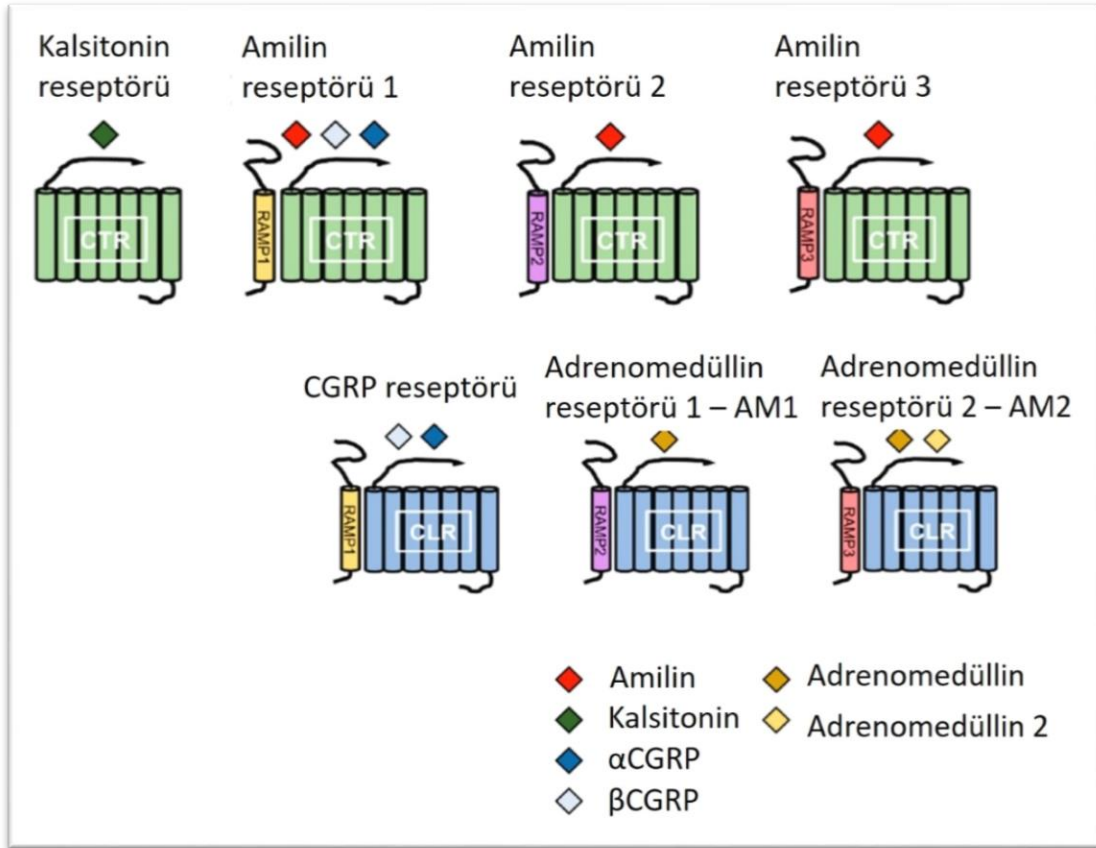
Adrenomedüllin, ilk olarak 1993 yılında Vazointestinal Peptid'i de keşfeden Kitamura ve ark. tarafından feokromasitomalı bir hastadan izole edilen ve temel olarak adrenal medulladan salgılanan 52 aminoasit uzunluğunda peptid bir hormondur [1]. İlk yapılan çalışmalarda damarlarda tansiyon regülasyonu üzerindeki etkileri üzerine yoğunlaşmış ve kalsitonin ilişkili peptid (Calcitonin-gene-related-peptide - CGRP) gibi, vücutta bugüne kadar bulunan en güçlü vazodilatör etkiye sahip hormon ile %20 yapısal homoloji göstermesi nedeniyle adrenomedüllinin de güçlü bir vazodilatör etkiye sahip olması gerektiği düşünülmüş ve ilk yapılan deneylerde bu etki kanıtlanmıştır [6]. Daha sonra adrenomedüllinin; kalsitonin gen ailesine ait olan kalsitonin, CGRP ve amilin ile çok benzer yapıda olduğu bulunmuş ve CGRP ve adrenomedüllinin hücrelerde 'kalsitonin benzeri reseptör' (calcitonin receptor-like receptor - CLR) üzerinden etki yapabildiği ve hücre içi siklik-AMP düzeyini etkiledikleri bulunmuştur [7]. İlginç bir biçimde tiroid, adrenal medulla ve pankreas adacık hücreleri gibi farklı yerlerden salgılanan ancak disülfid bağları ile ortak halkasal yapı benzerliği sahip bu dört ayrı peptid hormonunu bir grup olarak değerlendirmek ve benzer reseptörler üzerinden vücutta pek çok düzenleyici görev üstlendiğini söylemek yanlış olmaz (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Adrenomedüllin peptid yapısı. Halka ile işaretli yer disülfid bağı ile oluşan ve kalsitonin gen ailesindeki diğer hormonlarla yapısal benzerliği oluşturan halka yapısını göstermektedir. Bernard M.Y. Cheung and Fai Tang, “ Adrenomedullin: Exciting New Horizons”, Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery (Under Re-organization) (2012) 6: 4.

Bu keşif ile birlikte adrenomedüllinin, kalsitonin gibi kemik dokusu üzerine etkili olabileceği düşünülmüştür. Etki mekanizması incelendiğinde, ilk yapılan araştırmalarda aynı reseptörü paylaşan bu hormonların reseptöre ne zaman ve nerede etki edeceği reseptör aktivitesi modifiye edici protein (*receptor activity-modifying protein* - RAMP) üzerinden sağlanmakta olduğu; RAMP1 proteini reseptör ile birleştiğinde, reseptör öncelikle CGRP ile aktive olmakta, RAMP2 ve RAMP3 proteinleri ise reseptörü adrenomedülline daha spesifik hale getirdiği düşünülmekteydi [8]. Kısmen doğru olsa da, daha sonradan yapılan araştırmalarda aslında adrenomedullinin bağlandığı reseptörün CLR ailesine ait AM₁ ve AM₂ ve RAMP ligandlarının kombinasyonu ile oluşan bir reseptör ailesi olduğu anlaşıldı [9]. Ek olarak, kalsitonin reseptörü (CTR), AM₁₋₂ ve RAMP₁₋₂₋₃ reseptörlerinin kombinasyonları ile tüm kalsitonin ailesine ait peptid hormonlar hücre zarında kendine ait reseptörde, reseptör aktivasyonu gerçekleştirebilmektedir [10] (Şekil 2.2).

Adrenomedüllinin hücre nükleusundaki etkisinin ise nüklear-k β üzerinden gerçekleştirdiği; osteoklast ve osteoblast farklılaşmasını bu yolak ile düzenlediği yönünde çalışmalar mevcuttur [11].



Şekil 2.2. Kalsitonin ailesine ait peptidler ve reseptörleri. CLR, RAMP ve CTR reseptörleri kombinasyonu ile oluşturulan reseptörler tüm kalsitonin ailesindeki peptidlere özel olarak farklılık göstermekte.

Kiriyama, Y. and H. Nochi, Role and Cytotoxicity of Amylin and Protection of Pancreatic Islet β -Cells from Amylin Cytotoxicity. Cells, 2018. 7(8): p. 95.

Daha sonraki yıllarda bu ortak grubun çok farklı dokularda etkileri olması, adrenomedullin üzerine yapılan araştırmaları da tetiklemiş ve adrenomedullinin vasküler, retina, over, kemik ve pek çok farklı dokuda etkileri olduğu bulunmuştur [12]. Beyin travması geçiren hastaların serebrospinal sıvılarında da yüksek miktarda adrenomedullin bulunmuş, iskemik beyin dokularında vazodilatatör etkisi ile nöroprotektif bir molekül olduğu belirtilmiştir [13-15]. Hipertansiyon, kronik böbrek

yetmezliği, septik şok ve hatta myokard infarktüsü gibi farklı hastalık koşullarında da adrenomedullin seviyesi anlamlı olarak yüksek bulunmuş ve prognostik bir gösterge olarak kullanılabilceği bildirilmiştir [3]. Bu gibi durumlarda adrenomedullinin yüksek bulunması, daha çok vücutun stres yaşadığı anlarda konsantrasyonun arttığını ve bunun adrenal medulladan salgılanması ile ilgili olabileceğini akıllara getirmektedir. Yine sporcularda yapılan bir çalışmada, egzersiz ve hipoksinin adrenomedüllin serum seviyesini yükselttiği raporlanmıştır [16]. Bu çalışmaların yanında 'adrecizumab' adı verilen adrenomedüllin antagonisti yeni bir monoklonal antikorun, septik şokta aşırı biçimde artmış olan ve vasküler geçirgenliği aşırı arttırarak damarlardaki sıvının ekstraselüler alana geçmesine neden olmasını engelleyebileceği üzerine klinik çalışmalar da mevcuttur [17].

Adrenomedullinin malignitelerdeki rolü de yeni bir araştırma alanı olarak son yıllarda karşımıza çıkmaktadır. Pavel ve ark. nöroendokrin tümörlerin patolojik olarak adrenomedullin salgılayabileceğini ve hatta bir prognostik faktör olarak da kullanılabilceğini belirtmişlerdir [18]. Anjiogenezis ve vazodilatatör etkisi nedeni ile patolojik olarak kanser hücreleri tarafından salgılanıp metastaz sürecinde rol aldığından şüphelenilmiş ve adrenomedullinin (22-52) fragmanının endotelial geçişi ve vaskülarizasyonu azalttığı yayımlanmıştır. Ancak bu etkinin, fragmanın agonist veya antagonist etkisinden mi kaynaklandığı konusunda görüş ayrılıkları mevcuttur [19, 20].

İnflamasyon üzerine yapılan adrenomedüllin çalışmaları, bu hormonun basit bir damarsal tonus düzenleyicisi olmaktan çok, hücre proliferasyonu ve apoptozu üzerine oldukça karmaşık etkileri olduğunu da göstermiştir. Hu ve ark. tarafından sıçanlarda yapılan çalışmada, adrenomedüllinin NF-k β sinyal yolağı üzerinden Leydig hücrelerinde inflamasyonu azalttığı ve apoptozu durduğu gösterilmiştir [21]. Şaşırtıcı biçimde adrenomedüllinin (22-55) fragmanı, yapay olarak artrit geliştirilen farelerde inflamasyonu baskılamış ve hem sistemik kemik yıkımını durdurmuş hem de anti-inflamatuar bir karakter sergilemiştir [22].

Adrenomedüllinin kemik doku ve özellikle osteoblastik aktivite üzerindeki etkilerini en kapsamlı araştıran ise Yeni Zelanda'dan Cornish ve ekibi olmuştur. 1997'deki çalışmasında çeşitli adrenomedullin fragmanlarının ve amilinin in vitro olarak osteoblastlara proliferatif etkisi olduğunu; aynı zamanda in vivo olarak kemik

yoğunluğunu arttırdığını da belirledi [23]. Böylelikle 1-22 ve 1-27 fragmanlarının adrenomedüllin hormonuna, vasküler dokudaki CGRP reseptörlerini aktive edebilmeleri için gerekli olan halka yapısını kazandırdıkları ancak osteoblastlardaki reseptörlerin tüm adrenomedüllin fragmanına ihtiyaç duymadan aktive olabildiği anlaşıldı [24].

Cornish ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada düzenli aralıklarla adrenomedüllin 27-52 verilen bir grup farede placebo alan gruba göre anlamlı derecede kemik yoğunluğunda artış olduğu görüldü [4]. Adrenomedüllinin, kemikteki bu anabolik etkisinin osteoporoz tedavisinde kullanılabileceği hipotezi ortaya atıldı. Bu hipotezde ileri sürülen ana düşüncenin kaynağı; bugüne kadar geliştirilen çoğu osteoporoz ilacının anti-resorptif etkinin azaltılması üzerinden kemik yoğunluğunu arttırmakta olması ve bu etki stratejisinin yan etkisi olarak kemiğin yapısında bozulma ve elastik modulusundaki değişim sonrası bazı hastalarda patolojik kırıklar meydana gelmesidir. Adrenomedüllini, bu gibi lokal ve sistemik yan etkileri olmadan oldukça spesifik bir osteoblast proliferatif ajan olarak kullanma düşüncesi şu an için pek çok araştırma gerektiren olgunlaşmamış bir düşünce olarak hala kalmakla beraber bu konuda pek çok patentin de şimdiden alındığını söylemek gerekir (ABD Patent No: US 6.440.421)

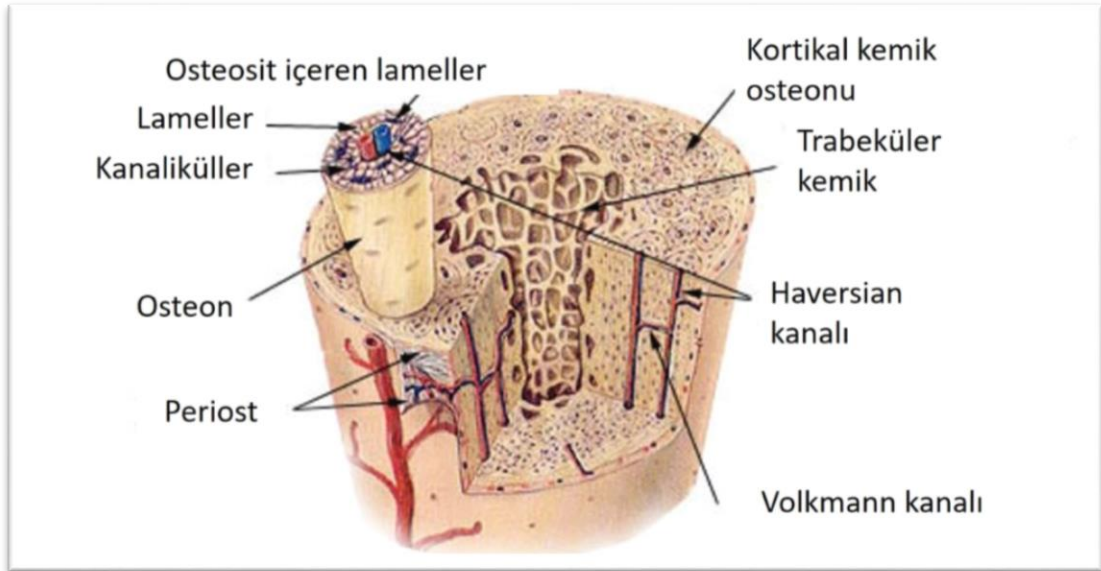
2.2. Kemiğin Genel Özellikleri

Kemik vücudun en sert dokusu olarak vücuda yapısal destek olma ve organları koruma görevini üstlenen, yapısının yüzde 60'ı hidroksiapatit gibi inorganik moleküllerden oluşmasına rağmen klasik öğretilerin tersine metabolik olarak oldukça aktif ve içinde hala tam bilinmeyen pek çok mekanizma bulunduran bir dokudur. Vücudun diğer organlarından salgılanan pek çok hormon ile endokrin iletişim halinde mineral dengesini sağlamakta ve kendi içinde de Wolf kanunu gibi temel prensipler ile basınç değişimlerine karşı sürekli olarak remodele olarak yapısal organizasyonunu yenilemektedir [25]. Bu sebeple kemikle ilgili yapılan araştırmalarda kemiğin yapısını ve fizyolojisini bilmek önem arz etmektedir.

2.2.1. Kemiğin Yapısı

Kemik genel olarak kortikal ve trabeküler kemik olarak yapısal olarak ikiye ayrılır. Kortikal kemik, kemik iliğini çevreleyen ve kemiğin yapısal dayanıklılığını oluşturan sert dış katmandır ve inorganik maddelerden daha zengin olması ile beraber Haversian ve Volkmann kanalları ile birbirine bağlantılı osteon kümelerinin birleşmesi ile oluşur. Bu kanal sistemi tüm vücutta yaklaşık 3.5 m²'lik bir alanda kemik dokuya madde alışverişi sağlar. Kortikal kemiğin dışı periost denilen ve kemiği bir zar gibi kaplayan fibröz bir bağ dokusundan oluşur. Periost, kemiği korur, içindeki damarlar ile kortikal kemiğin dış 1/3'ünün beslenmesi sağlar ve kemiğin hasarlanmasında tekrar kemik dokuyu oluşturmak için bünyesinde osteoblastlara dönüşebilen 'kemik yüzey hücreleri' adı verilen hücreleri barındırır.

Trabeküler kemik ise kemiğin iç kısmında yer alan yapısal olarak daha elastik ve Young elastik modülüsü daha az olan; bu sebeple kortikal kemiğe göre daha az sertlikte ancak daha hafif ve içinde tüm hematopoetik kök hücreleri barındıran kemik iliğini muhafaza eden gözenekli yapıya sahip kısımdır. Metabolik olarak kortikal kemiğe göre daha aktiftir ve Wolf kanununa göre remodeling kapasitesi çok daha hızlıdır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Trabeküler ve kortikal kemiğin makroskopik yapısı. National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program, Emory University, Atlanta SEER Cancer Registry, Atlanta, Georgia.

Mikroskopik düzeyde ise kemik, ‘örgümsü’ denilen ve kollajen fibrillerinin düzensiz olarak dağılması ile karakterize olgunlaşmamış kemik ile lameller kemik denilen düzenli kollajen organizasyonunu sağlamış lameller katmanlarından oluşan olgun kemik olarak ikiye ayrılır. Lameller kemik bu düzgün organizasyonu sayesinde örgümsü kemikten çok daha dayanıklıdır. Örgümsü kemik, genellikle osteoblastların çok hızlı osteoid (kemik matriks) ürettiği kırık iyileşmesi veya fetal kemik üretimi sırasında görülür. Bu sebeple kırık bölgesindeki örgümsü kemikten oluşan kallus dokusu olgun lameller kemik kadar mekanik dayanıklılığa sahip değildir. Sağlıklı bir erişkinde ise kemik yapısının tamamı lameller kemikten oluşmaktadır.

2.2.2. Kemik Hücreleri

Osteoblastlar, mezenkimal kök hücrelerden (osteoprogenitör hücreler) köken alan mononükleer ve kemik matriks (osteoid) salgılama ve osteoklastları regüle etme görevini üstlenen kemiğin en temel hücresidir. Latent olarak aktif olmadıkları zamanlarda kemik yüzeylerinde ‘kemik yüzey hücreleri’ne dönüşüp inaktif şekilde bekleyebilirler ve gerektiği zamanlarda (travma vb.) tekrar osteoblasta dönüşebilirler. Bir diğer yolak ise, osteoblastların aktivitelerini kaybetmeyip kendi ürettikleri osteoid içerisinde kalarak osteosit hücrelerine dönüşebilmeleridir [26].

Osteositler, kemikte hücre kompozisyonunun %90’ına yakını oluşturur. Histolojik olarak inaktif şekilde osteoid içinde duruyor gibi gözükseler de sinir hücrelerindeki benzer dendritik bağlantılar ile diğer osteositler ile haberleşebilirler. Bu sayede, osteoklastlara ve osteoblastlara kemiğin neresinin rezorbe edilmesi gerektiğini veya yapılması gerektiğini ‘*Wnt-beta katherin*’ yolu aracılığı ile bildirerek, kemiğin remodele olmasında önemli bir rol oynadıkları düşünülmektedir [27].

Osteoklastlar, kemiğin resorbe edilmesinden sorumlu, çok nükleuslu ve hematopoetik kök hücre sisteminin monosit-makrofaj fagositik hücre grubuna dahildirler. Hücre membranlarında çok fazla iyon kanalları bulunur ve bu iyon kanalları ile hücre dışı matrikse proton iyonları pompalayarak ortamı asidik hale

getirirler ve kemikteki minerallerin çözülmesini sağlarlar. Hawship lakünaları adı verilen bu asidik alan ile proteazlar yardımıyla kemik resorpsiyonu gerçekleşir [28].

2.2.3. Kemik Matriksi

Osteoid olarak da isimlendirilen kemik matriksi organik ve inorganik olarak ikiye ayrılır. Kemik kuru ağırlığının çoğu inorganik matriksten oluşur ve hidroksiapatit $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ en fazla sentezlenen inorganik moleküldür. Yapısı kalsiyum ve fosfattan oluştuğu için yapıtaşı moleküller besinsel olarak alınmak zorundadır ve bu regülasyonu düzenleyen D vitamini ve parathormon düzeyindeki değişiklikler hidroksiapatit üretimi ile yakından ilgilidir. İnorganik matrikste bulunan diğer maddeler magnezyum, florür, sodyum ve bazı eser elementlerdir.

Organik matriksin ise çoğunluğunu Tip 1 kollajen oluşturur. Kalan küçük kısım ise osteonektin, sialoproteinler, proteoglikanlar ve az miktarda başka tip kollajenlerden oluşmaktadır. Organik matriks, kemiğe esnekliğini veren ve tekrarlayan kuvvetlere karşı dayanımını sağlayan yapıdır.

2.2.4. Kemik Fizyolojisi

Kemiğin yaşayan bir organizma olmasını sağlayan, kemiği oluşturan tüm hücre gruplarının koordineli olarak uyum içerisinde çalışmasına bağlıdır. Bu uyum sayesinde ortalama bir insan 10 yıl içerisinde tüm kemik dokusunu yıkıp baştan yenileme kapasitesine sahiptir. Kemiğin rejenerasyon kapasitesi şaşırtıcı derecede yüksektir ve skar dokusu oluşturmadan tamamen rejenere olabilen tek doku memeli canlılarda kemiktir. Bu özelliğin evrim sürecinde ilkel atalarımızın tüm ekstremiteleri rejenere etme kapasitesinden kalmış olabileceği ancak evrimsel süreçte çeşitli yaralanmalarda enfeksiyon gibi olumsuzluklara savunmasız olan rejenerasyon sürecinin, yerini skar dokusu ile yaranın hızlıca kapatılması lehine değiştiği teorisi öne sürülmüştür [29].

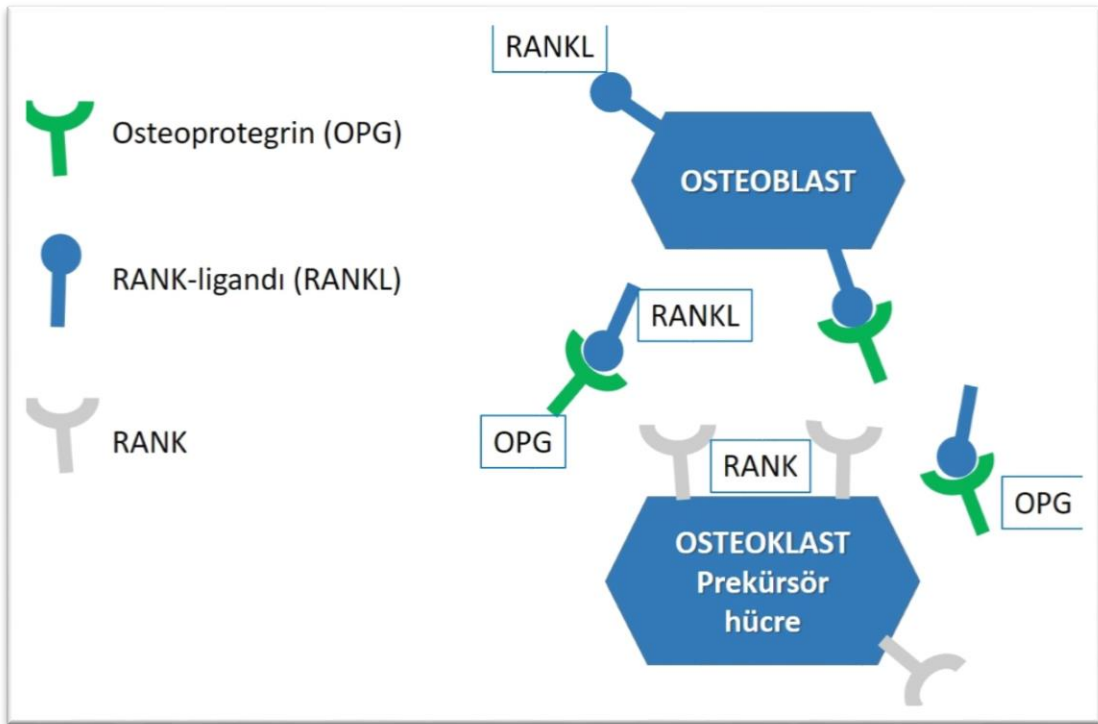
Kemiğin fizyolojik olarak ana görevi, kalsiyum, fosfor ve hatta magnezyum metabolizmasını endokrin sistem yardımıyla düzenlemektir. D vitamini ve

parathormon (PTH) bu düzenlemede ana yardımcı hormonlardır ve bağırsaklar, böbrekler ve kemikler arasında bu düzenlemeyi kontrol ederler. Osteositler, dendritik bağlantılar ile diğer osteositler ve kemik matriks arasında kemik minerallerin alışverişini yönetirler. Bunun dışında osteoblastlar üzerinde de gerek PTH gerekse D vitamini için reseptörler bulunur. D vitamini kalsiyum emilimini arttırdıktan sonra RANK reseptörleri üzerinden kemik hücre komponentlerini düzenler. Osteoblastları aktifleştirip osteoid sentezini indükler ve daha sonra osteoklastları da sekonder olarak aktifleştirip kemik kütlesinin artmasını ama bunu yaparken de yapım ve yıkımının dengeli olmasını sağlar. Ayrıca osteokalsin gibi organik matriks yapımını da artırır. PTH ise aralıklı ve düşük dozlarda salgılandığında osteoblastlardaki reseptörleri sayesinde osteoid yapımını indükler. Osteoklastlardaki etkisi düşük dozlarda daha çok RANK yolağı üzerinden osteoblastlar ile kontrol edilmekle birlikte, parathormonun yüksek dozları direk olarak osteoklastları aktifleştirip kemik yıkımını artırır. Bu etki özellikle hiperparatiroidi veya malignitelere bağlı paraneoplastik PTH sentezinde kemik yıkımına bağlı ciddi klinik tablolar oluşturabilir [25].

Hücresele düzeyde kök hücrelerden farklılaşmalara baktığımızda da PTH'nın, osteoblastların mezenkimal kök hücrelerden farklılaşmasında da etkin rol oynadığı bilinmektedir. PTH dışında büyüme hormonu (GH), insülin benzeri büyüme hormonu (IGF-1) ve son zamanlarda pek çok araştırmanın konusu olan *Bone Morphogenetic Factor* (BMP), osteoblast farklılaşmasında en önemli moleküllerdir. BMP, RUNX2 geni aktivasyonunu arttırarak hücre çekirdeğinde etkisini gösterir ve non-steroid inflamatuvar ilaçların kesin kanıtlar olmasa da bu geni inaktive ederek özellikle kırık iyileşmesinde osteoblastları inaktive ederek iyileşmeyi geciktirdiği öne sürülmektedir [30].

Osteoklastların farklılaşması ise osteoblastlar üzerinden RANK-RANKL yolağı veya direk hemotopoetik yolla Monosit Koloni Stimüle Edici Faktör (M-CSF) aracılığı ile gerçekleşir. Osteoblastların, osteoklastları RANK-RANKL yolağı ile hücre çekirdeğinde tirozin kinaz üzerinden aktive etmesi son yılların popüler araştırma konusudur. RANK-RANKL aktivasyonunu dengelemek amacıyla osteoblastlardan aynı anda 'osteoprotegrin (OPG)' adı verilen ve RANK ile RANK-ligandının (RANKL) bağlanmasını engelleyen bu molekül sayesinde osteoklastların

fazla aktifleşmesi engellenmektedir (Şekil 2.4). Osteoprotegrin latince ‘kemik (osteo)’ ve ‘korumak (protegere)’ kelimelerinin birleşmesinden oluşmakta ve bu tabir tam anlamıyla fonksiyonunu yansıtmaktadır. Osteoklastların farklılaşmasını engelleyen bu molekülü, kemik rezorpsiyonunu azaltması nedeniyle günümüzde osteoporoz tedavisinde kullanılmak üzere pek çok çalışma yürütülmektedir [31].



Şekil 2.4. RANK-RANKL ve osteoprotegrin (OPG) ilişkisi

2.3. Kemik Defektleri

Kemik defektlerini incelemeyen önce kemiğin nasıl defektsiz olarak nasıl iyileştiğini bilmek gerekir. Travma sonrasında kırılan bir kemiğin iyileşme sürecini detaylandıracağız.

2.3.1. Kırık İyileşmesinin Fizyolojisi

Uygun koşullar sağlandığında kemik çok yüksek bir iyileşme potansiyeline sahiptir ve yüzde yüz olarak rejenere olma kapasitesi ile skar dokusu bırakmadan

iyileşebilen vücuttaki tek dokudur. Yine de yeterli stabilizasyon olmadığında, doku beslenmesinin bozulması veya rejenerasyonu etkileyen bazı durumlarda kaynama gecikmekte veya kaynamama oluşarak psödoartroza kadar gidebilen tedavisi zor patolojik bir durum oluşabilmektedir.

Kırık iyileşmesini temel olarak primer (direk) veya sekonder (indirek) iyileşme olarak ikiye ayırabiliriz.

Sekonder İyileşme

İndirek veya sekonder iyileşme kemik iyileşmesinin en sık görülen formu olup, temel olarak kırık sonrası kallus oluşması ile karakterizedir. Sekonder iyileşmede anatomik redüksiyon gerekmemekte, aksine mikro hareket ve kısmi ağırlığa maruz kalma ile iyileşme artmaktadır. Opere edilmeyen, konservatif olarak alçı ile takip edilen olgular ve mikroharekete izin veren teknikler ile yapılan operasyonlarda sekonder iyileşme görülür. Temel olarak inflamasyon sonrasında oluşan kırıkta bir kallus dokusu sonrasında, kırıkta doku zemininde endokondral ossifikasyon ve kemik yüzeyinden progenitör hücrelerle sağlanan intramembranöz kemikleşme ile karakterizedir. Kallus dokusu oluşmasıyla daha geniş yarıçapı nedeni ile kemiğin geçici olarak biyomekanik olarak daha dayanıklı olması sağlanmaktadır [32]. Sekonder iyileşme sırasında inflamasyon, yumuşak ve sert kallus oluşumu ve remodele olma evreleriyle incelenir.

İnflamasyon. Travma sonrasında kırık oluştuktan sonraki ilk 7 günü kapsar. Kırık uçlarında damarların kopması nedeni ile kan göllenmesi olur ve kemik uçları nekroza gidip ortama sitokinler salgılanmaya başlar. Sitokinler ve inflamasyon ortamdaki kanın hematoma dönmesini hızlandırır ve kallus için bir hematoma kalıbı oluşur. *Tumor necrosis factor* (TNF), interlökinler (IL-1, IL-2, IL-6) ve *trombocyte growth factor* (TGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *fibroblast growth factor* (FGF) ve BMP gibi büyüme faktörleri hematoma içinde çoğalıp ortama makrofaj, fibroblast ve mezenkimal kök hücrelerin kemotaksis yapmaları sağlanır [33]. Tüm bu sitokin ve büyüme faktörü yağmurunun, mezenkimal kök hücrelerin osteoblast prekürsörlerine dönüşmelerini sağladıkları kanıtlanmıştır [34].

Yumuşak kallus. Kallus için öncü olan bu hematoma ve inflamasyon karışımı, kök hücrelerin osteoblast ve kondroblastlara farklılaşması ile 7-9. günlerde fibrinden

zengin bir granülasyon dokusuna dönüşür ve ardından tip 2 kollajen sentezi başlayarak hyalin kırıkta oluşumu başlar. Oluşan bu kırıkta kallus dokusuna 'yumuşak kallus' denir. VEGF yardımıyla damarlanmada artış başlar ve kırık bölgesinin artan enerji ve oksijen ihtiyacı artan kan akışı ile karşılanır. Bu esnada makrofajlar kemik uçlarındaki nekrotik dokuyu debride ederler ve ossifikasyona hazır hale getirirler.

Sert Kallus. Yumuşak kallus oluşumunu, travmayı takiben 2-3. haftalardan itibaren sert kallus oluşumu izler. Sanılanın aksine yumuşak dokudaki kırıkta yapı direk olarak ossifiye olmaz. Kırıkta çatıdaki kondrositlerin tamamı apoptoza gidip fagosite edilerek yerine kemik çatı oluşturulur [35]. Tip 2 kollajen de yıkılarak yerini kemik dokusunun ana kollajen tipi olan tip 1 kollajen alır. Osteoblastlar yardımı ile mineralizasyon ve osteoid yapımı başlar. Bu safhadan itibaren mineralizasyon nedeni ile kallus radyografik olarak görüntüleme seçilebilmektedir.

Remodeling. Kırıkta çatı yerine oluşturulan sert kallus kemik çatısı, örgümsü kemikten oluşan, düzensiz kollajen ve ossifikasyondan oluşan bir dokudur. Hacim olarak da kırık kemik uçlarından büyük olan kallus dokusu zamanla osteoklastlar tarafından yıkılıp yerine osteoblastlar tarafından lameller kemik dokusu oluşturulur. Bu kırığın 4. haftasından başlayan ancak 1-2 yıl gibi çok uzun süreler alabilen bir süreçtir. Remodeling evresinde osteoklastlar RANK-RANKL yolu üzerinden aktive olurken, Wnt-beta katenin yolu üzerinden Wolf kanunu prensipleri ile kemiğin mikroskobik yapısı düzenlenir [36].

Primer İyileşme

Primer veya direk iyileşme doğada oldukça nadir görülür, çünkü teknik olarak kırık uçları arasında hücresel düzeyde büyük bir gap olmadan, stabil bir anatomik redüksiyon gerektirir. Bu koşullar sağlandığında kırık bölgesinde lameller kemiğin direk remodele olmasıyla kırık uçları arasında Haversian kanallar ve vaskülarizasyon kallus gerektirmeden oluşur. Primer iyileşme, kontakt iyileşme ve boşluk (gap) iyileşme olarak ikiye ayrılır. Kontakt iyileşme, kırık uçları arasında 0.01 mm veya fragmanlar arası deformasyonun %2'den az olduğu koşullarda gerçekleşir [37]. Bu durumda literatürde 'cutting cone' denilen, uçları osteoklastlardan oluşan ve arka dış kısımlarında osteoblastların toplanması ile günde 50 ila 100 µm hızında ilerleyen

'kesme konisi' oluşur ve kırık uçları arasında osteoklastlar tünel açıp, sonrasında osteoblastlar ile açılan kısım osteoid ile doldurulur [35]. Böylece kırık uçları arasında kallus oluşmadan direk olarak Haversian kanallar açılıp aynı zamanda vaskülarizasyon da sağlanmış olur. Boşluk (gap) iyileşme ise, kırık uçları arasında 0,8 ila 1 mm arası bir boşluk vardır ve ancak anatomik stabil fiksasyon sonrasında lameller kemik ile 'cutting cone' oluşturulmadan boşluk doldurulur ve ardından ikincil olarak osteonlar ile kallus oluşmadan kaynama sağlanmış olur [38].

Görüldüğü üzere kırık iyileşmesi süreci oldukça karmaşık, sitokinler, büyüme faktörleri, apoptoz gibi hücrelerarası parakrin etkileşme gerektiren bir süreçtir. Bunun yanında uygun kanlanma ve mekanik stabilizasyon da kaynama için elzemdir ve bu basamaklardan bir tanesinin bozulması kaynamama gibi sorunlara yol açabilir.

2.3.2. Kemik Defekti Tanımı ve Fizyolojik Olarak Kırıktan Farkları

Kemik defekti ortopedi ve maksillofasyal cerrahide sık karşılaşılan klinik bir problem olup, genellikle yüksek enerjili kırıklar, tümör rezeksiyonları, konjenital agenezi/segmental defektler ve osteomyelit sonrasında görülmektedir. Klinik pratikte bu defektler otolog veya allogreft kemik greftleri ile doldurularak greftlerin osteojenik veya osteokonduktif özelliklerinden yararlanılır. Ancak kaynamama, yetersiz yumuşak doku, kanlanma problemleri, enfeksiyon riski ve daha sonra ortaya çıkabilen biyomekanik yetersizlikler gibi komplikasyonlar kırık defekti tedavisinde oldukça sık karşılaşılmakta ve ortopedideki en zorlu tedavi edilen klinik problemlerden biri yapmaktadır [39]. Kemik defektin büyüklüğüne göre tedavi stratejileri de değişmektedir (Tablo 1). Temel olarak küçük kemik defektleri endokondral iyileşme ile iyileşirken, büyük defektler genellikle kaynamama veya psödoartroz gibi komplikasyonlara neden olur. Tedavi sürecinde ise distraksiyon osteogenezisi primer iyileşmeye verilebilecek örnektir.

Tedavi Seçeneği	Defektin Büyüklüğü
Otolog kemik grefti	< 5cm
Allogreft	Sınırsız
Demineralize kemik matriks	Yetersiz kanıt
Bone morphogenic protein (BMP)	Yetersiz kanıt
Masqualet tekniği	5-24 cm
Distraksiyon Osteogenez	5-10 cm
Akut Kısaltma	1-3 cm
Vaskülarize Fibula	10-20 cm
Amputasyon	(-) Kurtarma tedavisi

Tablo 2.1. Kemik defekt büyüklüklerine göre tedavi stratejileri.

Kemik defektinin iyileşmesinde bu tedavi stratejilerinin farklı biyolojik özellikleri vardır. Osteojenik, osteoindüktif ve osteokondüktif olarak adlandırılan bu özellikler, greftlerin defekt bölgesine biyolojik etkilerine göre sınıflandırılmaktadır.

Osteojenik özellikteki greftler kendi bünyesindeki osteoblastlar ile yeni kemik yapımını uyaran materyallere denir. Klinikte sık kullanılan otolog kemik greftleri (iliak kanat vb.) osteoindüktif ve osteokondüktif özelliklere de sahip olsa da, osteojenik materyallere en fazla uyan örnektir.

Osteoindüktif greftler, defekt bölgesinde mezenkimal kök hücrelerin osteoblastlara dönüşümünü uyaran ve bu yolla kemik yapımını arttıran maddelere denir. BMP gibi büyüme faktörleri osteoindüktif maddelere örnektir.

Osteokondüktif maddeler ise kemiğe direk etkileri olmayan ancak kemik dokusunun üzerinde büyümesi için uygun bir skafold oluşturan maddelere denir. Günümüzde kullanılan taze dondurulmuş allogreftler, demineralize kemik matriksleri ve diğer deneysel sentetik maddeler osteoblastlar için uygun ortam oluşturması nedeniyle kullanılmaktadır [40].

Bu özelliklere sahip olan greftler kullanılmadığında, kemik defektleri genellikle kemiğin kendi rejenerasyon kapasitesinin üzerinde olması nedeniyle

kaynamama veya psödoartroz oluşur. Kaynamama süreçlerini incelemek üzere planlanan hayvan modellerinde genellikle segmental veya kritik kemik defektleri kullanılır. Her iki defekt modeli de temelde aynı yöntemle sahip olmakla birlikte kritik kemik defekti, kemik defektinin tek başına asla iyileşemediği ve biyomateryaller ile birlikte daha zorlu deney modellemeleri için kullanılmaktadır. Uzun kemiğin uzunlamasına kesitindeki elde edilen ve kemiğin eninin iki katı uzunluğundaki veya daha büyük defektler kritik kemik defekti olarak kabul edilir [41].

2.3.3. Segmental Kemik Defekt Modeli ve Kullanım Alanları

Hayvan deneylerinde kullanılan segmental uzun kemik defekt modelleri klinik pratikte tedavisi oldukça zor olan kemik defektli ve periostu zarar görmüş kırıkları taklit edebilmemizi sağlamanın yanında defekt bölgesinde araştırmanın konusu olan madde veya faktörlerin damarlanma, hücre proliferasyonu ve kemik yapımına olan etkisini araştırmak için de kullanılmaktadır [5]. Sıçan, tavşan ve fare modellerinde tibia, femur veya önkolda radius ve ulnada yaratılan defekt modelleri sıklıkla kullanılmaktadır. Bu hayvanlardaki hızlı rejenerasyon süreci sade kırık modellerinde genellikle tüm gruplarda iyileşmeye neden olmakta ve yanlış pozitif sonuçlara neden olabilmektedir. Bunun önüne geçmek adına segmental kemik modelleri geliştirilmiştir. Segmental kemik defektinin asıl amacı kırık modeline göre kaynamanın daha zor olması ve oluşan kaynamama modelinde stimüle edici faktörün etkisini daha iyi gözlemlene olanağı sunmasıdır. Segmental kemik defektlerinde femur ve tibia genelde fiksasyon ile incelenirken ulna veya radiusta oluşturulan modeller, sıçanların önkollarında pronasyon ve supinasyon hareketi olmadığı ve sinostoz olduğu varsayıldığı için fiksasyona ihtiyaç duyulmamaktadır. Önkolun aynı zamanda yük taşıyan bir yer olmaması fiksasyon ihtiyacını azaltmakla beraber mekanik yüklenme olmaması kırık iyileşmesi prensiplerinden birinin de canlandırılmamasına neden olmaktadır [42]. Literatürde değişik boyutlarda segmental defekt örnekleri mevcuttur. Kim ve ark. sıçanlarda 3 mm lik ulna segmental defekt modeli üzerinde çalışmışlar ve modelin uygulanabilir olduğunu göstermişlerdir [43]. Solheim ve ark. 11 mm gibi oldukça büyük bir defekt

oluşturmuşlar ve kompozit biyometaryalleri bu defekt üzerinde araştırmışlardır. Yine başka çalışmalarda 10 mm ile 5 mm arasında değişen büyüklükte segmental defekt modelleri mevcuttur [44-46]. Genel olarak segmental defekt modelleri biyomateryaller için kullanılmakta olsa da küçük segmental kemik defektlerin (2-5 mm) defekt bölgesine biyometaryal kullanmadan da hücre proliferasyonu ve damarlanmayı incelemek için kullanılmış olduğunu görüyoruz [5, 47].

Biz bu çalışmamızda adrenomedüllinin sistemik olarak verildiğinde osteoinduktif olarak segmental defekt bölgesinde iyileşme potansiyelini arttırıp arttırmadığını radyolojik ve histolojik olarak inceledik.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız, 15.01.2019 tarihli Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul toplantısının 2019/01-04 numaralı onayı ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın mali desteği Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Hızlı Destek Programı tarafından THD-2019-17992 proje kodu onayı ile sağlanmıştır.

Çalışmada 36 adet 300 gr ve üzeri erkek Wistar-Albino sıçan (rat) kullanılmıştır. Hayvan sayısı güç analizi yapılarak literatüre uygun olarak belirlenmiştir. Cerrahi girişimler Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Cerrahi Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiş ve işlem öncesi ve sonrası dönemde burada takip edilmiştir.

Deneyde kullanılan adrenomedüllin (22-52) fragmanı merkezi Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunan 'Genscript Biotech' (Piscataway, New Jersey, ABD) firmasından temin edilmiştir.

Deneyin sonlandırılmasından sonra mikrotomografi ile yapılan radyografik ölçümler Hacettepe Üniversitesi Beytepe Kampüsü'nde 'Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi (HÜNİTEK)' bünyesinde bulunan Bruker - Skyscan 1272 (Billerica, Massachusetts, ABD) mikrotomografi cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Mikrotomografi cihazından alınan veri ve görüntüler yine Bruker firmasının veri analizi için sağladığı 'CT Analysis (CTAn)' yazılımı ile analiz edilmiştir.

Mikrotomografi çekimlerinin ardından örneklerin histopatolojik olarak incelenmesi Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

Deneyde kullanılan sıçanlar 6 gruba ayrılmıştır (Tablo 3.1);

1.grup: 6 adet sıçanda bilateral olarak 2 mm radius kemik defekti oluşturulmuştur. Cerrahi teknik aşağıda özetlenmiştir. Defektin oluşturulmasından sonra 4 hafta iyileşme süresi beklenmiş, bu sürede intraperitoneal yolla sistemik haftada 3 kez olmak üzere 2 ml 0,9 izotonik NaCl solüsyonu verilmiştir. Hayvanlar

sakrifiye edildikten sonra bilateral üst ekstremitte amputasyonu yapılarak önkolda radius ve ulna kemiklerinin diseksiyonu gerçekleştirilmiştir. Diseke edilen örnekler radyolojik ve histopatolojik incelemeye tabi tutulmuştur.

2.grup: 6 adet sıçanda bilateral olarak 2 mm radius kemik defekti oluşturulmuştur. Cerrahi teknik aşağıda özetlenmiştir. Defektin oluşturulmasından sonra 8 hafta iyileşme süresi beklenmiş, bu sürede intraperitoneal yolla sistemik haftada 3 kez olmak üzere 2 ml 0,9 izotonik NaCl solüsyonu verilmiştir. Hayvanlar sakrifiye edildikten sonra bilateral üst ekstremitte amputasyonu yapılarak önkolda radius ve ulna kemiklerinin diseksiyonu gerçekleştirilmiştir. Diseke edilen örnekler radyolojik ve histopatolojik incelemeye tabi tutulmuştur.

3.grup: 6 adet sıçanda bilateral olarak 2 mm radius kemik defekti oluşturulmuştur. Cerrahi teknik aşağıda özetlenmiştir. Defektin oluşturulmasından sonra 4 hafta iyileşme süresi beklenmiş, bu sürede intraperitoneal yolla sistemik haftada 3 kez olmak üzere 2 ml 0,9 izotonik NaCl çözeltide 15 mikrogram (μg) Adrenomedüllin (22-52) verilmiştir. Hayvanlar sakrifiye edildikten sonra bilateral üst ekstremitte amputasyonu yapılarak önkolda radius ve ulna kemiklerinin diseksiyonu gerçekleştirilmiştir. Diseke edilen örnekler radyolojik ve histopatolojik incelemeye tabi tutulmuştur.

4.grup: 6 adet sıçanda bilateral olarak 2 mm radius kemik defekti oluşturulmuştur. Cerrahi teknik aşağıda özetlenmiştir. Defektin oluşturulmasından sonra 8 hafta iyileşme süresi beklenmiş, bu sürede intraperitoneal yolla sistemik haftada 3 kez olmak üzere 2 ml 0,9 izotonik NaCl çözeltide 15 mikrogram (μg) Adrenomedüllin (22-52) verilmiştir. Hayvanlar sakrifiye edildikten sonra bilateral üst ekstremitte amputasyonu yapılarak önkolda radius ve ulna kemiklerinin diseksiyonu gerçekleştirilmiştir. Diseke edilen örnekler radyolojik ve histopatolojik incelemeye tabi tutulmuştur.

5.grup: 6 adet sıçanda bilateral olarak 2 mm radius kemik defekti oluşturulmuştur. Cerrahi teknik aşağıda özetlenmiştir. Defektin oluşturulmasından sonra 4 hafta iyileşme süresi beklenmiş, bu sürede intraperitoneal yolla sistemik haftada 3 kez olmak üzere 2 ml 0,9 izotonik NaCl çözeltide 30 mikrogram (μg) Adrenomedüllin (22-52) verilmiştir. Hayvanlar sakrifiye edildikten sonra bilateral üst

ekstremitte amputasyonu yapılarak önkolda radius ve ulna kemiklerinin diseksiyonu gerçekleştirilmiştir. Diseke edilen örnekler radyolojik ve histopatolojik incelemeye tabi tutulmuştur.

6.grup: 6 adet sıçanda bilateral olarak 2 mm radius kemik defekti oluşturulmuştur. Cerrahi teknik aşağıda özetlenmiştir. Defektin oluşturulmasından sonra 8 hafta iyileşme süresi beklenmiş, bu sürede intraperitoneal yolla sistemik haftada 3 kez olmak üzere 2 ml %0,9 izotonik NaCl çözeltide 30 mikrogram (μg) Adrenomedüllin (22-52) verilmiştir. Hayvanlar sakrifiye edildikten sonra bilateral üst ekstremitte amputasyonu yapılarak önkolda radius ve ulna kemiklerinin diseksiyonu gerçekleştirilmiştir. Diseke edilen örnekler radyolojik ve histopatolojik incelemeye tabi tutulmuştur.

	İşlem	Örnek Sayısı
1. Grup	15 μg Adrenomedüllin (22-52) 4 hafta	12
2. Grup	15 μg Adrenomedüllin (22-52) 8 hafta	12
3. Grup	30 μg Adrenomedüllin (22-52) 4 hafta	12
4. Grup	30 μg Adrenomedüllin (22-52) 8 hafta	12
5. Grup	Plasebo – 4 hafta	12
6. Grup	Plasebo – 8 hafta	12

Tablo 3.1. Deney grupları

3.1. Cerrahi İşlem Tekniği

Çalışmanın cerrahi kısmına başlamadan önce yapacağımız cerrahi işlemleri ve mikrotomografik görüntülemenin ölçeklendirilmesine ön hazırlık adına, 1 adet daha önceki çalışmalarda kullanılmış ancak deney sürecinde yaşanan problemlerden dolayı çalışmadan çıkartılmış, doğal ömrünün sonuna yaklaşan 1 adet Wistar rat ile Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Cerrahi Araştırma Laboratuvarı'nda pilot deney uygulanmıştır. Aşağıda anlatılan tüm yöntemler bu sıçan üzerinde denendikten ve deney sürecine aşına olduktan sonra deney başlatılmıştır.

Sıçanların anestezisi, 35 mg/kg ketamin ve 5 mg/kg xylazine karışım dozu prensibi ile ayarlanmıştır. Hazırlanan karışım intraperitoneal yolla sistemik olarak uygulanmış ve ağırlı uyarana cevabın kesilmesinden sonra cerrahi işleme geçilmiştir.

Steril koşullarda, sıçan supin pozisyona alındı ve bilateral olarak önkol volar bölge klorheksidin solüsyonu ile temizlendikten sonra traşlandı (Şekil 3.1). Takiben önkol volar bölge radius üzerinden yapılan insizyon ile cilt ciltaltı geçildi ve önkol fleksör kas grubuna ulaşıldı (Şekil 3.2). Yumuşak doku korunarak kaslar ekarte edildi ve diseksiyonun ardından radius cisminde ulaşıldı. Takiben 1 adet Kerrison Ronger ile radius cisminde 2 mm lik kemik defekti yaratıldı (Şekil 3.3). Tüm gruplarda insizyon hattı %0.9 izotonik NaCl ile irriga edilerek anatomik olarak kapatıldı.



Şekil 3.1. Supin pozisyonda cerrahi bölgenin traşlanıp hazırlanması



Şekil 3.2. Önkol volar insizyon



Şekil 3.3. Kerrison ronger (solda) ile kemik defekti yaratılması işlemi

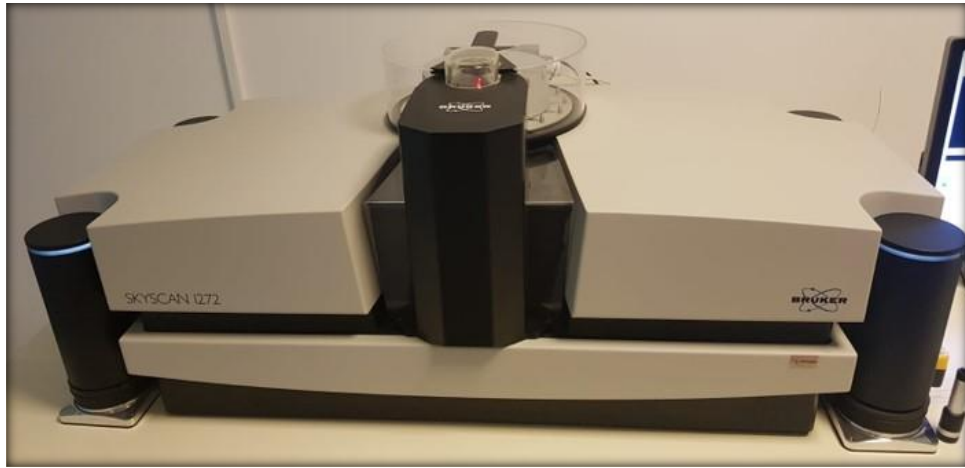
3.2. Cerrahi Sonrası Dönem

Cerrahi işlemden sonra hayvanlar her grup ayrı kafeste olacak şekilde 6 farklı kafese yerleştirildi. Anestezi sebebiyle kaybedilen hayvan olmadı. Kafeslerinde hareket kısıtlılığı uygulanmadı ve serbest şekilde beslenmelerine izin verildi. Tüylerinde dökülme, hareket azlığı ve ağırlıklarında değişim olup olmadığı not alındı. Herhangi bir enfeksiyon veya komplikasyon olmadı.

Hayvanlar kafeslerinde 4 ve 8 haftalık sürelerle izlendi ve haftalık olarak enjeksiyonlar sırasında muayeneleri yapıldı. Deney süresi biten hayvanlara karbondioksit ötenazisi uygulandı [48]. Ötenazinin ardından hayvanların bilateral önkolları ve dirsek eklemlerinin mekanik olarak zarar görmemesi için distal humerus seviyesinden ampute edildi ve örnekler tamponlu %10 formolin solüsyonunda fikse edildi.

3.2.1. Radyolojik Görüntüleme ve Değerlendirme

Ardından doku örnekleri fosfat tamponunda hazırlanmış oda ısısındaki %10'luk formalin çözeltisinde (pH 7.0) tespit edilmiştir. Formalin ile fiksasyondan sonra Hacettepe Üniversitesi HÜNİTEK bünyesinde bulunan masaüstü mikrotomografi ile radyolojik tetkikler kısmına geçildi. Mikrotomografi cihazındaki (Bruker – Skyscan 1272; Billerica, Massachusetts, ABD) görüntülemeler için örnekler cihaz içine çekim için özel kaplarda fikse edildi (Şekil 3.4–3.5).

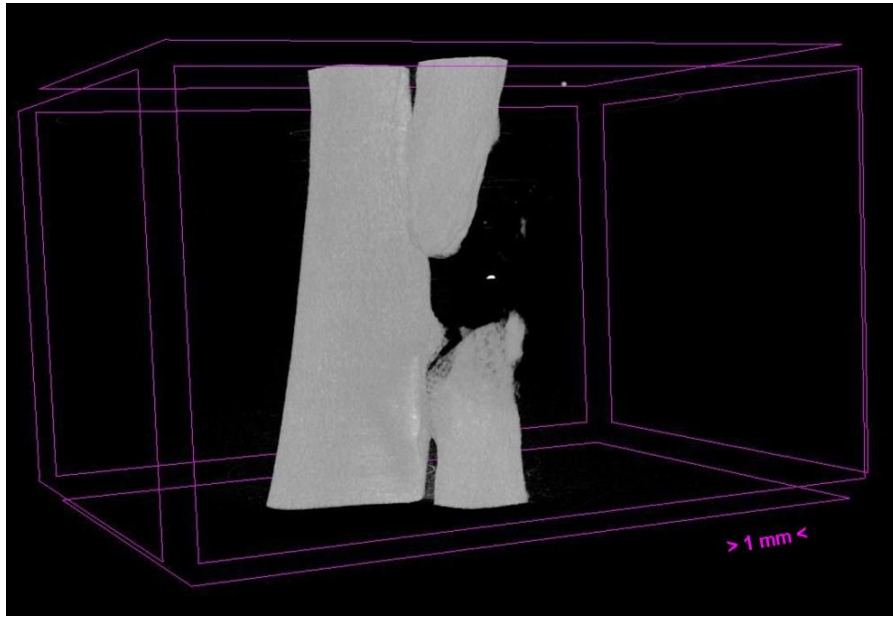


Şekil 3.4. Mikrotomografi cihazı.



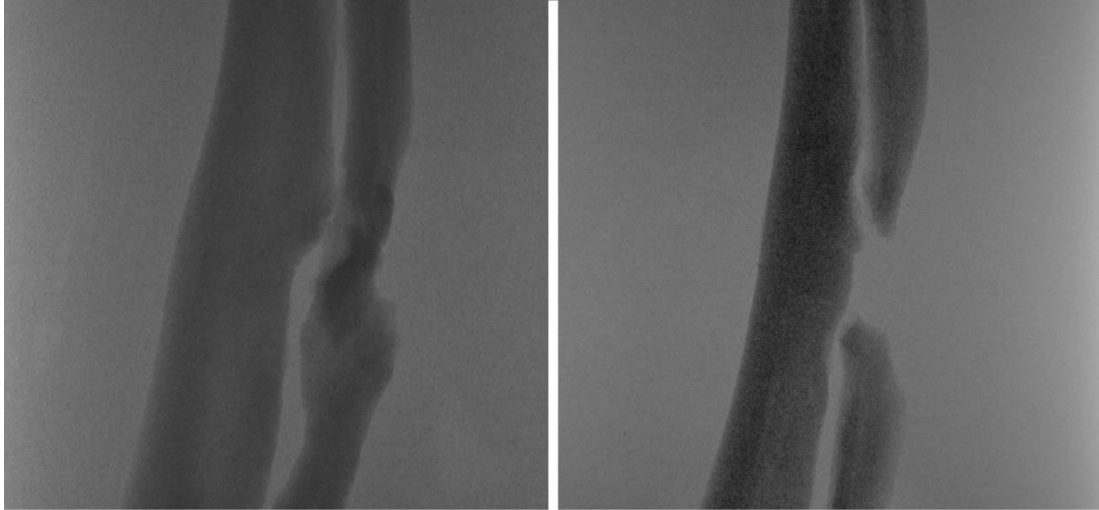
Şekil 3.5. Örneklerin mikrotomografi cihazı içinde tespiti

Mikrotomografi çekimleri, 70 kilovolt (kV) voltaj ve 114 mikroamper (μ A) akım altında, 204 milisaniye integrasyon zamanı ve bir örnek için ortalama 1200 görüntüleme ile uygulandı. Daha sonra elde edilen ham yansımalar 2052 x 2052 görüntü matriksinde, 7 μ m voksel büyüklüğü kullanılarak rekonstruktö edildi. Takiben mikrotomografiden alınan ham veriler dijital ortama aktarıldı ve Bruker CT Analysis (CTAn ver. 1.16.1.0) yazılımı kullanılarak iki boyutlu analizi yapıldı. Fazla artefaktlı olan görüntülerin artefaktları CTAn yazılımı ile analizden önce temizlendi. Yapılan analizde Kemik Hacmi (KH), Kemik Yüzeyi (KY), Trabeküler Kalınlık (TbKa), Kemik Hacmi/Kemik Yüzey Oranı (KH/KY) ve Kemik Mineral Yoğunluğu (KMY) değerlendirildi. Ayrıca Bruker CTvox (Billerica, Massachusetts, ABD) programı yardımı ile defekt bölgesinin üç boyutlu görüntüleri elde edildi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Defekt bölgesinin üç boyutlu olarak incelenmesi

Mikrotomografi cihazından çekim esnasında aynı zamanda yüksek çözünürlüklü dijital radyografik görüntüler de elde edilmiş (Şekil 3.7) ve bu görüntüler üzerinden defekt bölgesindeki kaynamayı puanlandıran Lane ve Sandhu kriterleri ile her bir örneğe 0-12 arası puanlar verilerek değerlendirme yapılmıştır (Tablo 3.1).



Şekil 3.7. Defekt bölgesinin kaynamasını ve kaynamamasını gösteren örnekler. Lane ve Sandhu sınıflaması ile bu grafiler puanlandırılarak değerlendirildi.

Lane ve Sandhu kemik defekt iyileşmesi değerlendirme kriterleri		
Durum	Radyolojik Bulgu	Skor
Kemik oluşumu	Yeni kemik/kallus yok	0
	Yeni kemik/kallus \geq %25 defekt alanı	1
	Yeni kemik/kallus \geq %50 defekt alanı	2
	Yeni kemik/kallus \geq %75 defekt alanı	3
	Yeni kemik/kallus = %100 defekt alanı	4
Kemik kaynaması	Kırık hatları belirgin	0
	Kırık hatları kısmen görünebilir	2
	Kırık hatları görünmüyor	4
Kemik yeniden şekillenme (remodeling)	Medüller kavite yeniden şekillenme bulgusu yok	0
	Medüller kavite oluşumu	2
	Medüller kavite ve korteks kanalizasyonu	4

Tablo 3.2. Lane ve Sandhu kemik defekt iyileşmesi değerlendirme kriterleri ve skorlama sistemi

3.2.2. Sanal Biyomekanik Değerlendirme

Mikrotomografi görüntülerinin verileri ile kaynama sağlanan örneklerde kaynayan kemiğin sanal biyomekaniğini değerlendirilmek üzere ANSYS Structurel (Canonsburg, PA, ABD) sanal biyomekanik analiz programına veriler yüklendi ve bu veriler analiz edildi.

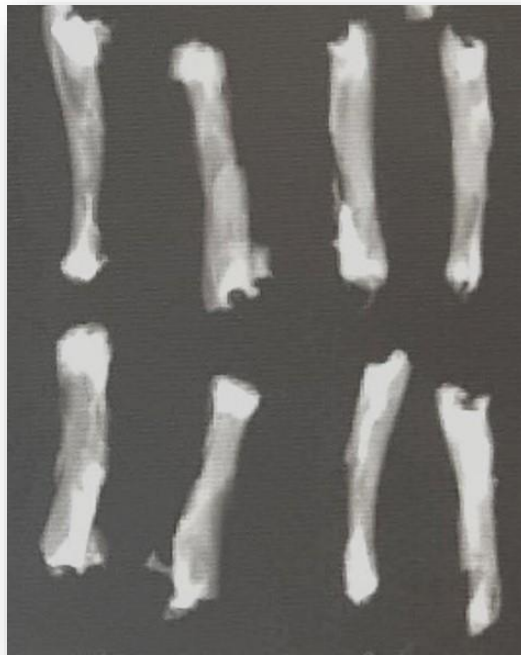
3.2.3. Histomorfometrik Değerlendirme

Bu radyolojik incelemelerden sonra önkollardaki yumuşak dokular kemik kortekse ve periosta zarar vermeyecek ve çok az bir miktar kemik üzerinde kalacak şekilde uzaklaştırıldı (Şekil 3.8). Örnekler histolojik inceleme hazırlığı için Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda %10'luk etilendiamintetraasetik asit solüsyonunda dekalsifikasyon için 4 hafta bekletildi. Dekalsifikasyon sürecini objektif olarak takip etmek için Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyoloji Anabilim Dalı'nda mamografi dozunda örneklerle radyografi çekilerek haftalık takipleri yapıldı (Şekil 3.9).

Dekalsifiye olan ve yumuşamış örnekler, fosfat tamponuna aktarılmış, sabit vakumlu doku takip cihazında (Leica, Almanya) dereceli alkollerden geçirilerek rutin yöntemle parafine gömülmüştür. Parafin bloklardan kızaklı mikrotomda (Leica, Almanya) 3-4 mikrometre kalınlığında seri kesitler alınmıştır [49]. Kesitler, genel morfoloji için hematoxilen eozin ve yeni kemik oluşunun kantitatif ölçümü için Masson trikrom yöntemleri ile boyandıktan sonra, Leica DMR 6000 model ışık mikroskopunda değerlendirilmiş ve Leica DC500 dijital kamera ile bilgisayar ortamına aktarılarak görüntü analiz programı (LAS v3, Leica, Almanya) ile segmenter defekt bölgesindeki yeni kemik alanı (YKA) ve toplam defekt alanı (TDA) milimetre kare cinsinden kantitatif olarak ölçülmüştür. Kesitlerde hasarlı kemik uçlarından genç kemik dokusunun ayrıldığı sınır baz alınarak ve oluşturulan hasar uzunluğu ölçülerek değerlendirme yapılmıştır. Daha sonra YKA'nın ve TDA'na oranı yüzde olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.8. Diseksiyon sonrasında önkolun görünümü



Şekil 3.9. Mamografi dozunda radyografi ile dekalsifikasyon takibi

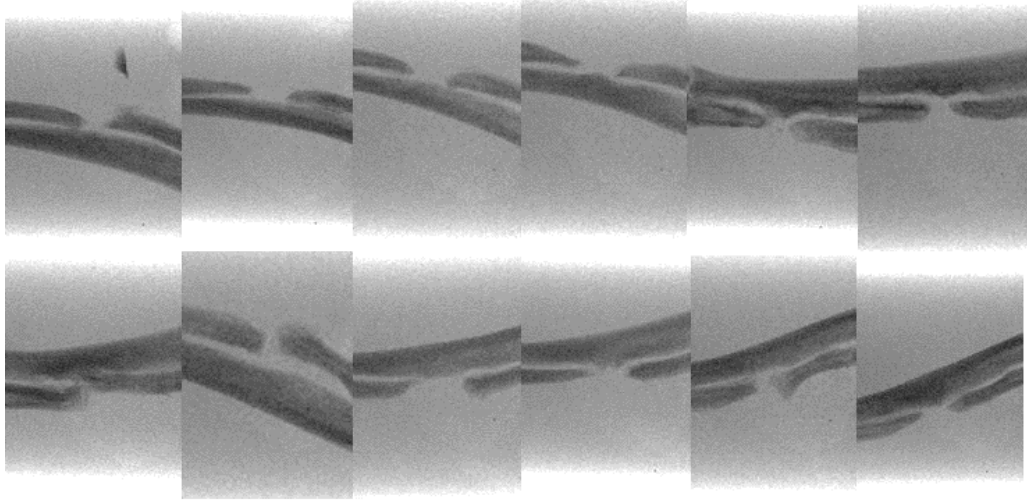
3.2.4. İstatistiksel Analiz

Bağımsız değişkenler gruplar ve zaman, bağımlı değişkenler histomorfometri, radyoloji ve mikrotomografi verileri olarak belirlenmiştir. Shapiro-Wilk testi kullanılarak verilerin normal dağılımları analiz edilmiştir. Parametrik olmayan datada gruplar arası karşılaştırmalar Kruskal Wallis testi, ikili karşılaştırmalar ise Mann Whitney U testiyle değerlendirilmiştir. İki farklı parametre arasındaki korelasyon Spearman testi ile analiz edilmiştir. İstatistiksel analizler %95 güven aralığında, SPSS (SPSS v23, IBM, ABD) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tanımsal istatistikler minimum, maksimum ve medyan değerleriyle gösterilmiştir.

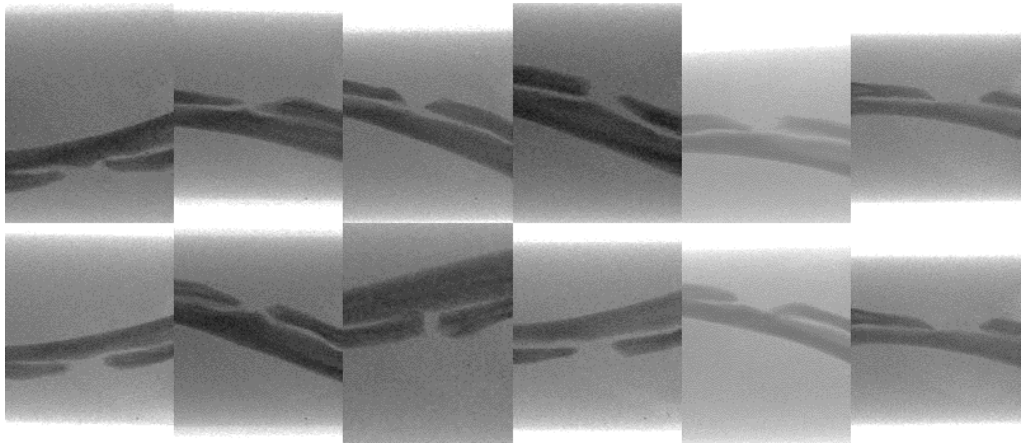
4. BULGULAR

4.1. Radyografik Bulgular

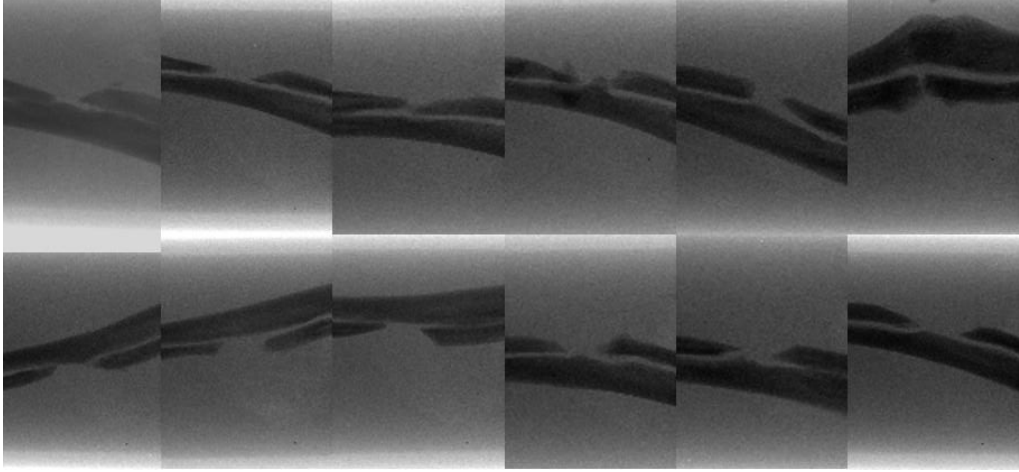
4 ve 8 haftalık iyileşme sürelerinden sonra ötenazi uygulanan hayvanların önkol diseksiyonları yapıldıktan sonra mikrotomografi cihazında yüksek çözünürlüklü dijital direkt radyografileri çekildi. Grafiler Lane ve Sandhu kemik defekti iyileşme kriterlerine göre iki ayrı gözlemci tarafından değerlendirilmiş ve ortalamaları alınarak gruplar arasında istatistiksel analiz yapılmıştır. Grafiler Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6 da verilmiştir. Grupların Lane ve Sandhu kemik defekti iyileşme kriterlerine göre puanları Tablo 4.1’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre gruplar arasında radyografik olarak istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır ($p = 0.608$).



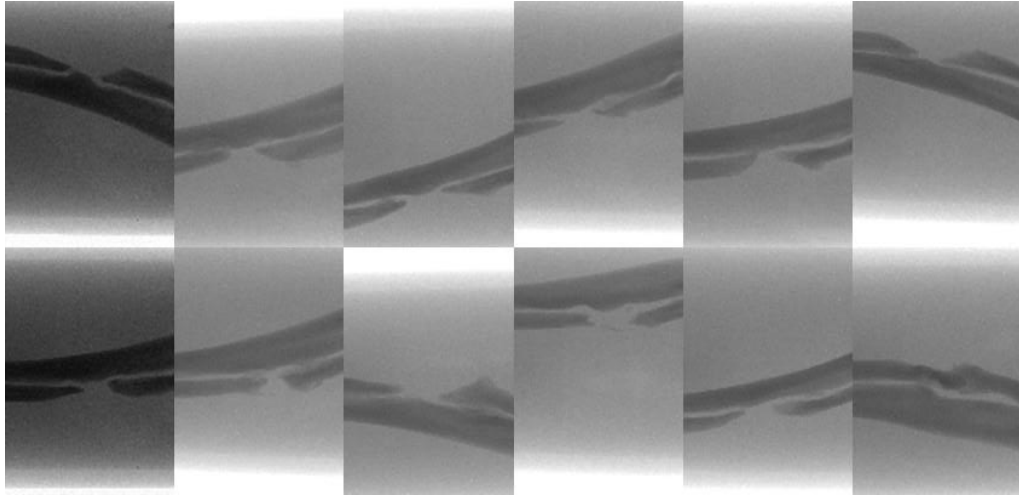
Şekil 4.1. 15 µg 4 hafta grubunun radyografik görüntüleri



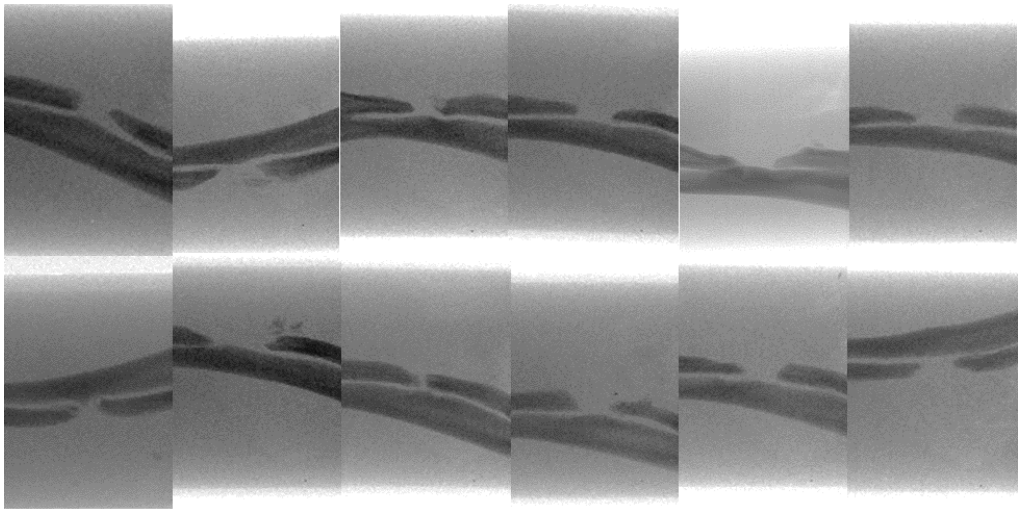
Şekil 4.2. 15 µg 8 hafta grubunun radyografik görüntüleri



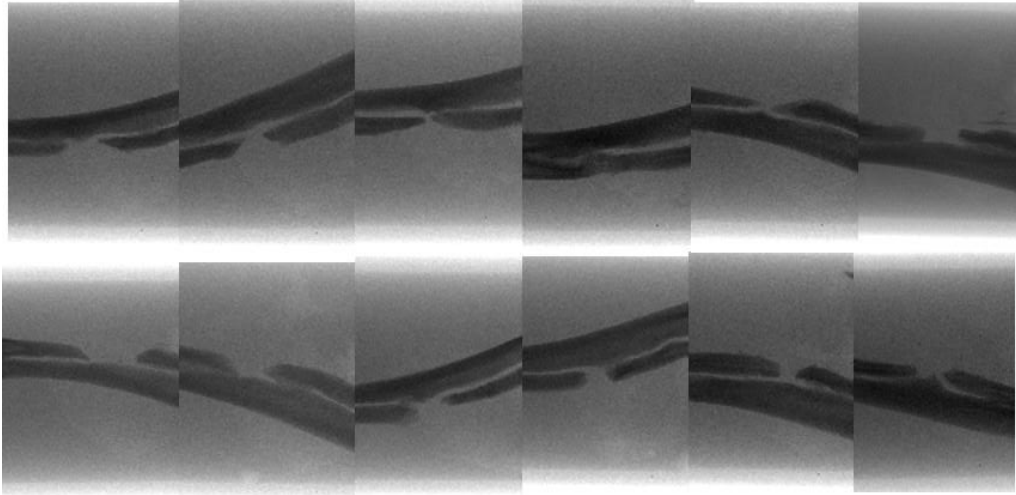
Şekil 4.3. 30 µg 4 hafta grubunun radyografik görüntüleri



Şekil 4.4. 30 µg 8 hafta grubunun radyografik görüntüleri



Şekil 4.5. Kontrol-4 hafta grubunun radyografik görüntüleri



Şekil 4.6. Kontrol-8 hafta grubunun radyografik görüntüleri

	Örnek Sayısı	Lane ve Sandhu Defekt Puanı	P değeri
1. Grup	12	1.09 ± 0.72	p = 0.608
2. Grup	12	1.11 ± 0.96	
3. Grup	12	1.18 ± 0.74	
4. Grup	12	1.08 ± 1.31	
5. Grup	12	0.98 ± 1.28	
6. Grup	12	1.25 ± 1.35	

Tablo 4.1. Lane ve Sandhu kriterlerine göre grupların defekt iyileşme puanları

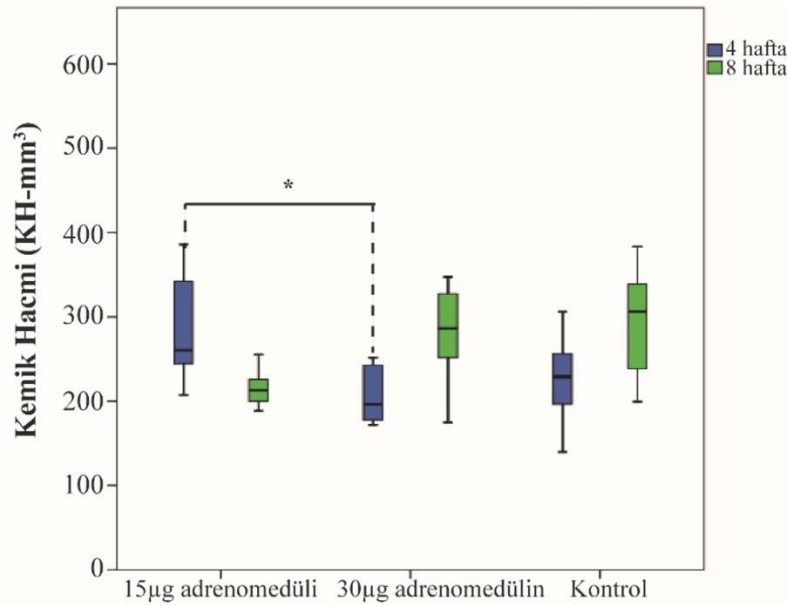
4.2. Mikrotomografi Bulguları

Gruplar arasında Kemik Hacmi (KH), Kemik Yüzeyi (KY), Trabeküler Kalınlık (TBKA), Kemik Hacmi/Kemik Yüzey Oranı (KH/KY) ve Kemik Mineral Yoğunluğu (KMY) değerlendirildi.

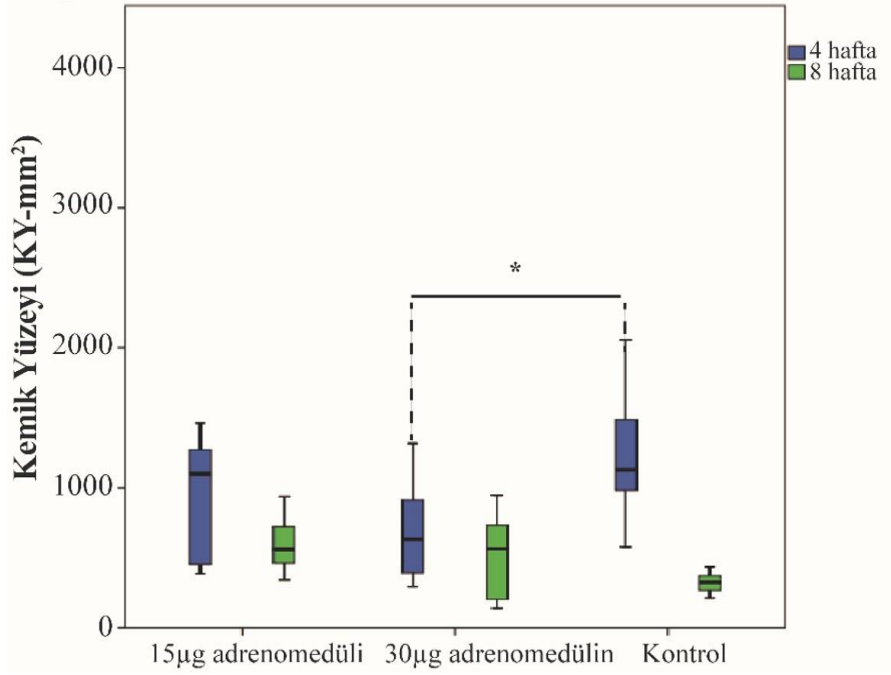
4 hafta 15 µg adrenomedüllin uygulanmış grubun kemik hacminde yüksek doz adrenomedüllin uygulanmış gruba göre anlamlı artış izlenmiş ($p=0.003$, Şekil 4.7), ancak kontrol grubu ile anlamlı olarak bir farka rastlanmamıştır (Şekil 4.7). Bununla beraber, 30 µg adrenomedüllin uygulanmış grubun kemik yüzeyi, 4. Hafta kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşüş göstermiştir ($p=0.005$, Şekil 4.8).

Bununla birlikte, 15µg adrenomedüllin uygulanmış grubun, kemik mineral yoğunluğunda, kontrol grubuna göre 8. haftada istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür ($p=0.001$, Şekil 4.9). Diğer gruplarda istatistiksel olarak fark bulunmamasına rağmen tüm adrenomedüllin verilen gruplarda kontrol grubuna göre KMY'de artış olduğu gözlenmiştir.

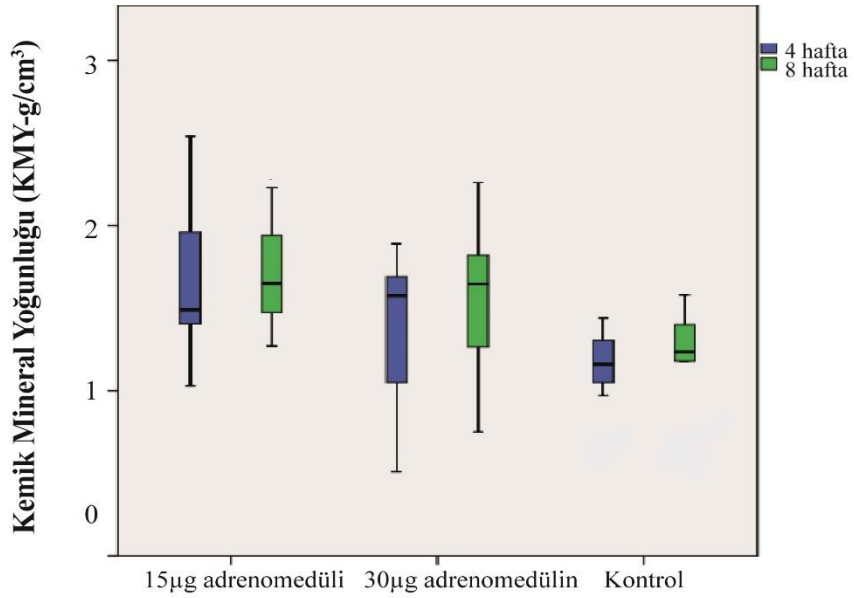
Bunun dışında mikrotomografi verileri kendi içinde incelendiğinde KH ile TbKa arasında ($p=0.002$, $r=0.627$; Şekil 4.10) ve KY ile KY/KH arasında ($p=0.0001$, $r=0.143$; Şekil 4.11) pozitif yönde, anlamlı korelasyon olduğu görülmüştür.



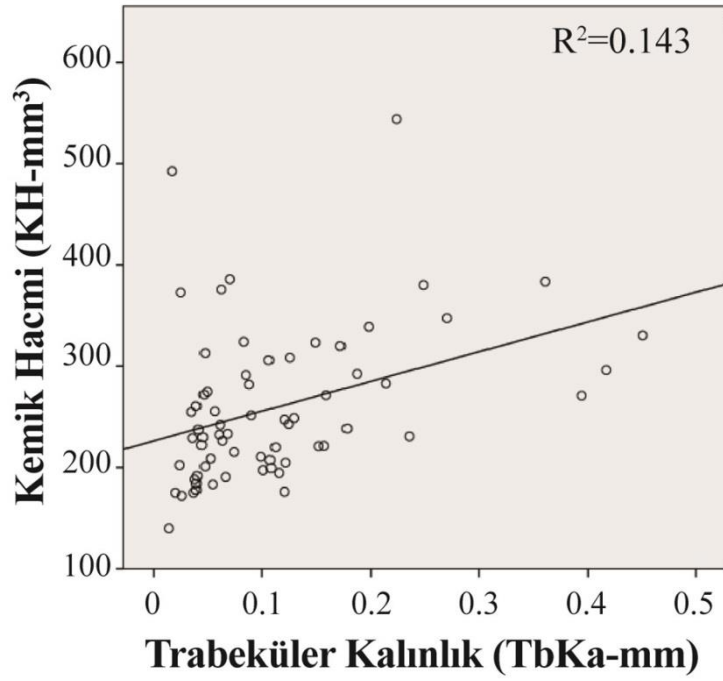
Şekil 4.7. Kutu çizgi grafiklerinde, mikrotomografik kemik hacmi analiz sonuçları verilmektedir. Dikey ekseninde kemik hacmi, yatay ekseninde ise gruplar görülmektedir. (*) Gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark $p<0.05$.



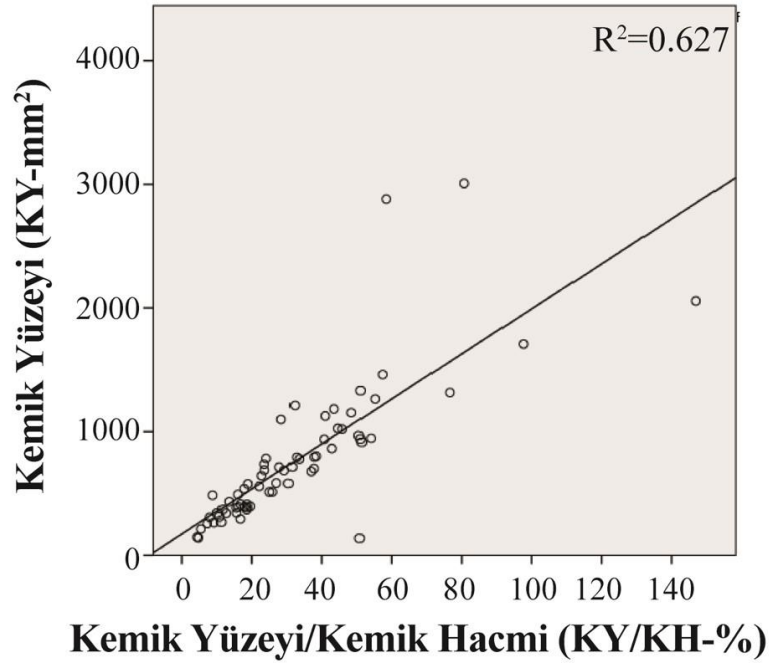
Şekil 4.8. Kutu çizgi grafiklerinde, mikrotomografik kemik yüzeyi analiz sonuçları verilmektedir. Dikey ekseninde kemik hacmi, yatay ekseninde ise gruplar görülmektedir. (*) Gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark $p < 0.05$.



Şekil 4.9. Kutu çizgi grafiklerinde, kemik mineral yoğunluğu (KMY) analiz sonuçları verilmektedir. Dikey ekseninde kemik mineral yoğunluğu, yatay ekseninde ise gruplar görülmektedir.

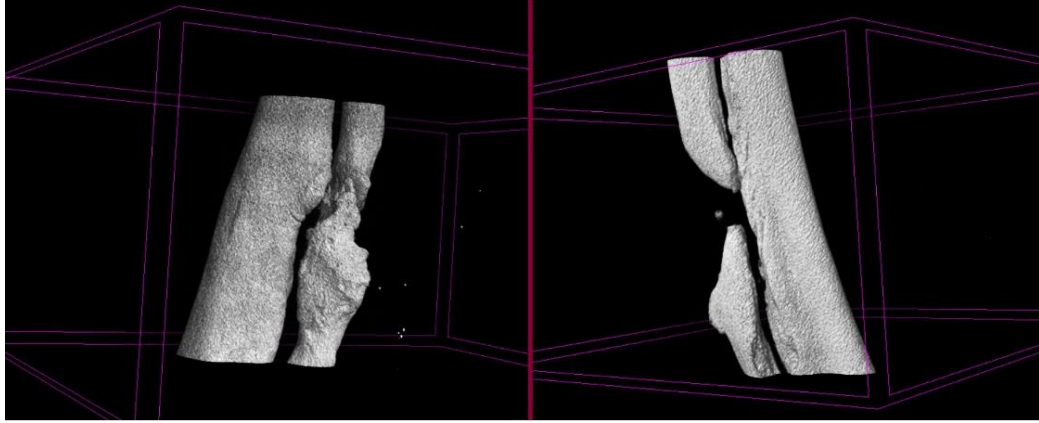


Şekil 4.10. Trabeküler kalınlık ile kemik hacmi korelasyon verilerinin birbiriyle olumlu korelasyon gösterdiği görülmektedir.



Şekil 4.11. Kemik yüzeyinin kemik hacmine oranı ile kemik hacminin birbiriyle olumlu korelasyon gösterdiği görülmektedir.

Bu bulguların haricinde mikrotomografi, defekt bölgesinin daha detaylı ve 3 boyutlu olarak incelenmesine olanak sağlamıştır (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Defekt bölgesinde iyileşme ve kaynamama görülen iki ayrı örneğin üç boyutlu mikrotomografi görüntüleri

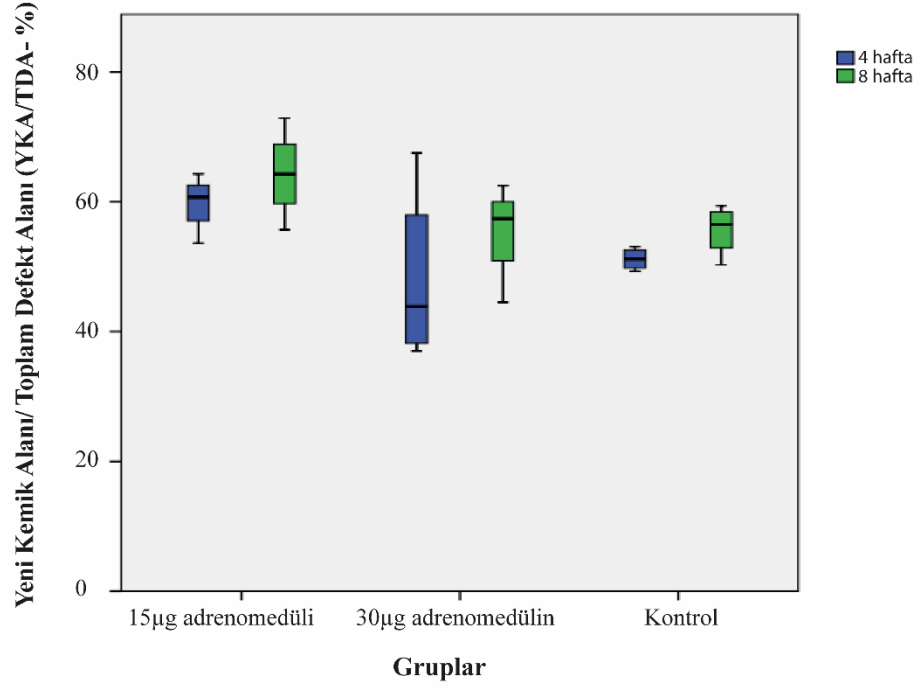
4.3. Sanal Biyomekanik Bulgular

Gruplar arasında istatistiksel analiz yapacak sayıda aşık bir kallus dokusu ile kaynama elde edilemediği için ANSYS Structurel programına yüklenen verilerde biyomekanik analiz için yeterli veri elde edilemedi ve çalışmanın bu kısmı iptal edildi.

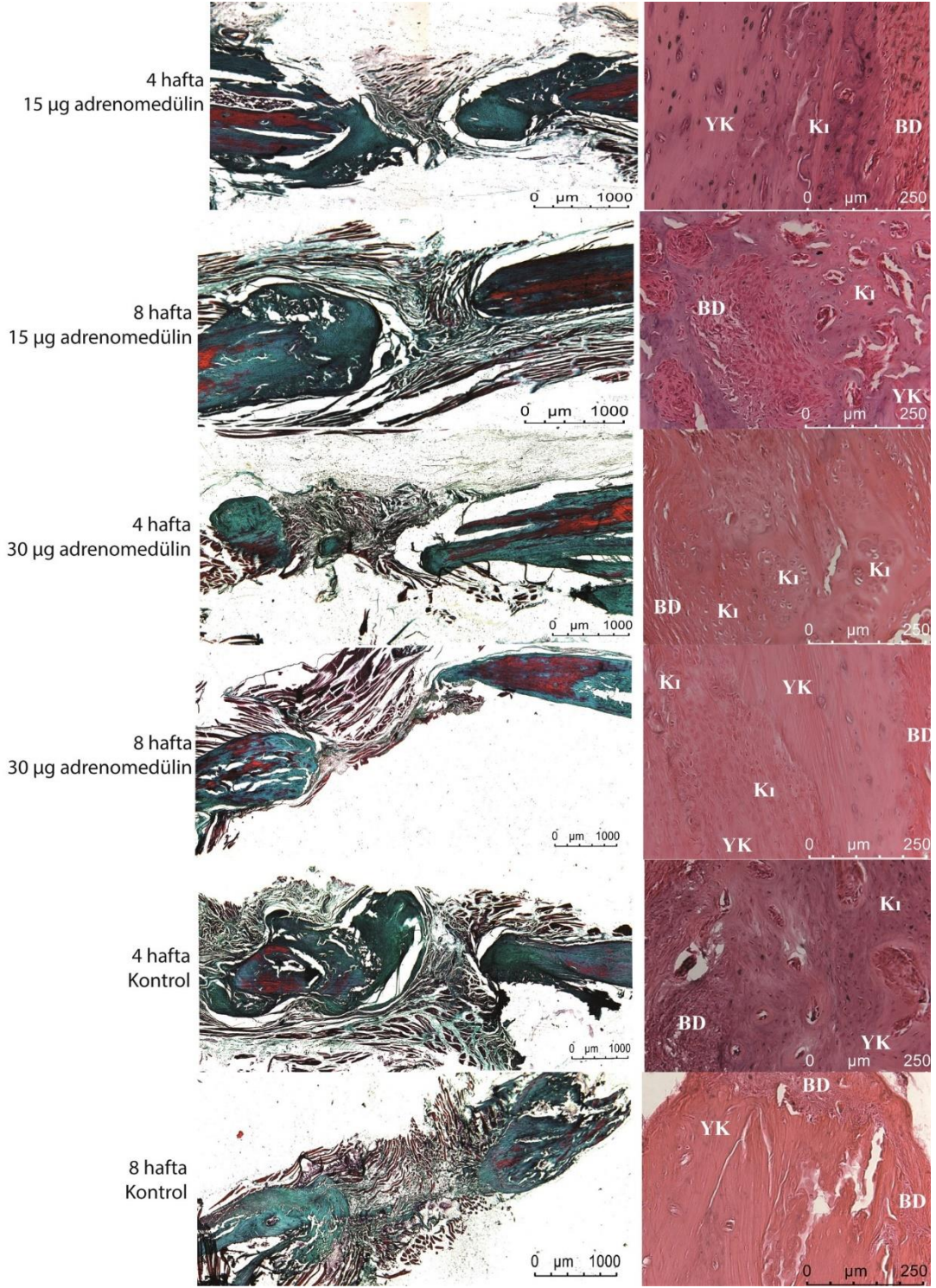
4.4. Histomorfometrik Bulgular

Deney ve kontrol gruplarında hasar bölgesinde kemiğin iki ucu fikse edilmediğinden açılı olarak durmakla birlikte, 4 ve 8. Haftalarda defekt bölgesindeki kemik uçlarında değişen miktarlarda yeni kemik dokusu oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.13). Sekizinci haftada hiçbir grupta tam kaynama gözlenmemiştir. Histomorfometrik değerlendirmelerde 4 ve 8. Haftalarda deney ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 4.14). Bununla birlikte, hasar bölgesinde, iki hasarlı kemik ucunda yaygın fibröz kallus ve kırık adalarına rastlanmıştır (Şekil 4.13). Yapılan değerlendirmelerde, 15µg adrenomedülin uygulanan gruplarda ilaç uygulanmayan kontrol ve yüksek doz adrenomedülin uygulanan gruplara göre defekt alanındaki yeni kemik miktarı

artmıştır (Şekil 4.13, Şekil 4.14). Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.14).

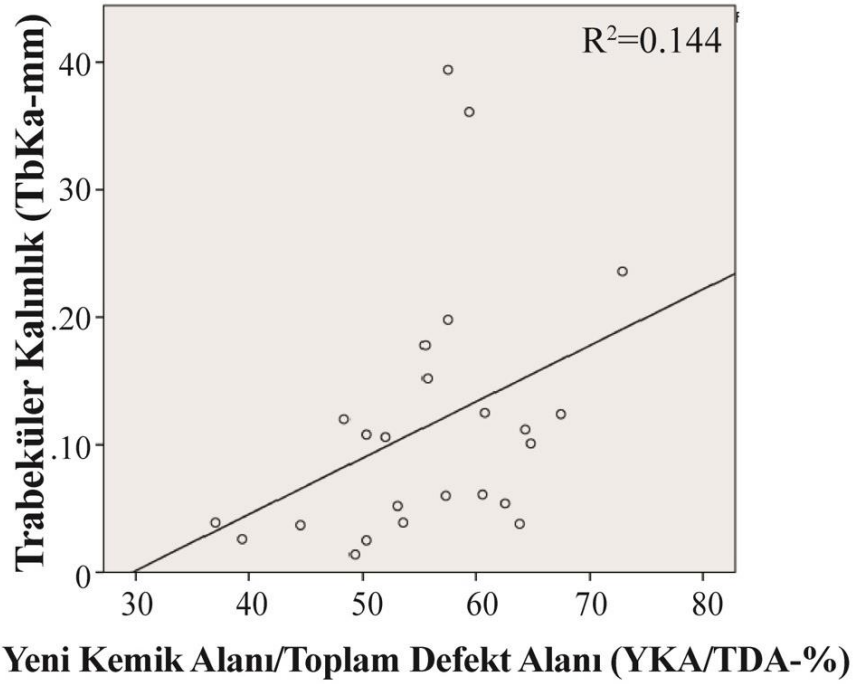


Şekil 4.14. Yeni kemik alanı/Toplam defekt alanı gruplar arası istatistiksel analizi. Kutu çizgi grafiğinde, histomorfometrik segmenter defekt bölgesindeki yeni kemik alanının toplam defekt alanına oranı analiz sonuçları verilmektedir. Dikey ekseninde yeni kemik alanının toplam defekt alanına oranı yatay ekseninde ise gruplar görülmektedir.



Şekil 4.13. Kontrol ve deney gruplarına ait mikrograflarda sol kolonda küçük büyütmede (x40) Masson trikrom (MT) ile kemikteki defekt alanı izlenmektedir. Sağ kolonda hematoxilen eozin (HE) ile büyük büyütmede (x200) hasar uçlarındaki yeni kemik ağı (YK), fibröz bağ dokusu [50] ve kıkırdak (K1) adaları izlenmektedir.

Mikrotomografi verilerinden trabeküler kalınlık ile histolojik olarak hesaplanan yeni kemik/defekt alanı oranının da verilerini karşılaştırdığımızda birbiriyle olumlu korelasyon gösterdiğini gördük ($p=0.02$, $r=0.144$) (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Yeni kemik alanının toplam defekt alanına oranı ile trabeküler kalınlık korelasyon verilerinin birbiriyle olumlu korelasyon gösterdiği görülmektedir.

Sonuç olarak, 15µg dozda adrenomedülin uygulamasının kemik onarımını tetiklediği ancak kemik uçlarında herhangi bir tespit malzemesi ya da doku iskelesi bulunmadığından tam kaynamanın sağlanamadığı görülmüştür. Adrenomedülin 30µg dozda uygulandığında kontrole göre anlamlı bir iyileşme sağlamamıştır. Kemik mineral yoğunluğunda ise defekt çevresindeki kemik dokuda 15 µg lık grupta kontrol grubuna istatistiksel olarak anlamlı fazla yoğunluk bulunmakta, diğer gruplarda da kontrol gruplarına göre istatistiksel anlamlı fark olmamasına rağmen fazla miktarda KMY olduğu göze çarpmaktadır.

5. TARTIŞMA

Kemik defektleri ortopedik cerrahide tedavisi oldukça zor ve maliyeti yüksek bir klinik problemdir. Defekt tedavisini araştırmak için kullanılan uzun kemik defekti hayvan modelleri ise pek çok biyomateryal ve sistemik uygulanan ajanlar için etkinliğin araştırıldığı uygun bir deney modeli olarak literatürde karşımıza çıkmaktadır [47, 51]. Özellikle segmental kemik defektleri, biyomateryaller ile defekt kaynama stimülasyonu elde etmek için kritik kemik defekti şeklinde büyük defektler olarak kullanıldığı gibi, kritik kemik defektinden daha küçük uygulanan segmental kemik defektleri kaynamama modeli elde etmek için kullanılmaktadır. Kırık modellerinin küçük memeli deney hayvanlarında metabolizmanın çok hızlı olması ve bunun kaynama istenmeyen gruplarda bile kaynamaya sebep olabilmesi yanlış pozitifliğe sebep olabilmektedir. Bu nedenle kaynamama modeli oluşturmak için araştırmacıları iyileşme olasılığı daha az olan ve dışarıdan bir biyomateryal veya biyolojik bir ajan stimülasyonu olmadan kaynamaya eğilimi az olan segmental kemik defektleri, kemik iyileşmesini stimüle eden ajanların araştırılması açısından popülerize olmuştur [52, 53].

Bu deneyde kemik defekti üzerine etkisini araştırdığımız adrenomedüllin peptidi son yıllarda popülerize olan ve vücuda etkileri yeni anlaşılmaya başlanan bir hormondur. Tezimizin giriş kısmında bahsettiğimiz gibi kalsitonin ailesinden olan bu hormonun sistemik (özellikle kardiyak) etkileri ve sepsis, miyokard infarktüsü gibi klinik durumlarda prognostik faktör olarak kullanılmaya başlanmasının dışında belli bir fragmanın (22-52) kemik dokuya olan etkileri farkedilmiş ve bunun üzerine kemik doku ve osteoblastlar gibi kemik hücrelerine olan etkileri *in vivo* veya *in vitro* olarak araştırılmaya başlanmıştır. Özellikle Cornish ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda osteoporotik farelerde ve osteoblast hücre kültürlerinde pozitif yönde etkileri bulunan adrenomedüllin hormonunun, kemikte travma sonrasında kemik iyileşmesini ne yönde etkileyeceğine dair bir çalışma literatürde mevcut değildir [54]. Özellikle vücutta stres koşullarının arttığı durumlarda adrenal medulladan ve diğer başka dokulardan (akciğer, beyin dokusu vb.) salgılanmasının artması ve miyokard, beyin gibi dokularda sitoprotektif etkilerinin kanıtlanması adrenomedüllin üzerine olan merakı daha da arttırmıştır [15]. Beyin travması sonrasında beyin

dokusunda artış gösterdiğinin kanıtlanması ve aynı zamanda kemikte osteoblastları indükleyip, osteoklastların farklılaşmasını azaltan böyle bir hormonun, beyin travmalarının eşlik ettiği multitravma hastalarında sonra görülen hızlı kallus oluşma sürecinde de rol alıp almadığını, ayrı bir araştırma konusu olarak ele alınmasına değer görmekteyiz [11, 14, 15].

Genel olarak farelerde çalışılmış olan adrenomedüllin hormonunun sıçanlarda bugüne kadar yapılmış bir çalışması yoktur [54]. Ancak farelerde yapılmış olan çalışmalardan, uygulanan doz aralıklarını sıçanlara göre ayarlamış olmamıza rağmen yine de canlıların farklı dozlara farklı reaksiyonlar göstermiş olabileceğini unutmamak gerekir. Doz ayarlaması için öncelikle Cornish ve ekibinin farelerde 8 µg ile yaptıkları çalışmayı örnek aldık ve literatürde gösterilen biçimde bunu sıçanın ağırlığı ve vücut yüzeyini baz alarak sıçana uyarladık. Bu uyarlamayı baz alırken verdiğimiz doza bağlı olarak sıçan vücudunda en az 93 µmol/kg molarite dozunda adrenomedüllin (22-52) olmasını sağladık ki; bu da Cornish ve ark. tarafından deneylerde efektif bulunan amilin ve adrenomedüllin dozu baz alınarak hesaplanmıştır [4, 55, 56]. Kabaca fareye göre iki katı olması gereken efektif doz 15 µg seçilmiş, ancak etkinin doz bağımlı olup olmadığına bakmak için ise 30 µg'lık, normalin iki katı fazla miktarda doz alacak gruplar da oluşturulmuştur.

Çalışmamızdaki direkt radyografik bulgulara göre gruplar arasında Lane ve Sandhu defekt iyileşme kriterine göre adrenomedüllin uyguladığımız defekt bölgeleri ile kontrol gruplarına arasında istatistiksel olarak anlamlı fark çıkmamıştır. Gruplar arasında fark yaratacak bir iyileşme oluşmaması nedeniyle bu sonuç beklediğimiz şekilde çıkmıştır. Defekt bölgesinin puanlandırma sınıflama sistemlerinin genelde kallus dokusunun artması ile duyarlılığı ve seçiciliği artmaktadır. Ancak unutulmamalıdır ki, direkt radyografik değerlendirmelerin gözlemci bağımlı olması ve defekt iyileşmesini değerlendirecek (biyometaryal olmaksızın) çok çeşitli kriter bulunmaması sebebi ile bu alanda daha iyi bir puanlama sistemine ihtiyaç duyulabilir [57]. Biz bu nedenle daha objektif değerlendirme yapabilmek adına çalışmamızın radyolojik kısmını büyük oranda mikrotomografiye ayırdık.

Mikrotomografi ile yapılan çalışmalara baktığımızda, kullanım alanlarının özellikle deney hayvanları ile yapılan kemik doku araştırmalarında oldukça sık olduğunu görürüz. Mikrotomografi sadece görsel olarak ilgili dokuyu detaylı

göstermek ile kalmaz, aynı zamanda kantitatif olarak da çok detaylı veriler sağlar. Kemik ile ilgili kullanılan parametreler trabeküler kemik ve kortikal kemik ana başlığında toplanırlar. Trabeküler kemik ile ilgili başlıca kantitatif değerler; trabeküler kemik hacmi ve trabeküler kalınlıktır. Kortikal kemik ile ilgili kantitatif değerler ise; kortikal kemik hacmi, kortikal kalınlık olmak ile birlikte, toplam kemik hacmi/yumuşak doku hacmi (kemik fraksiyonu) de kemiğin yapısal sağlamlığını göstermede kemik mineral yoğunluğuna benzer olarak kullanılan bir parametredir. Defekt veya kırık bölgesindeki kallus veya yeni kemik oluşumunu değerlendirmek için kemik yüzeyi/kemik hacmi oranına bakılabilir veya direk olarak kallus hacmi üç boyutlu olarak hasar bölgesinde hesaplanabilir [58]. Kemik mineral yoğunluğu (KMY) ise özellikle osteoporoz çalışmalarında sıkça kullanılabilen parametrelerden biridir [59, 60]. KMY, Hounsfield unitesi (HU) birimi cinsinden ölçülür ve mikrotomografi değerlendirme yazılımları (CTan vb.), mikrotomografi görüntülerinde seçilmiş bir alandaki mineral yoğunluğunu, daha önce cihaza belli dansiteye sahip materyaller ile ölçeklendirilerek karşılaştırır ve kantitatif olarak HU cinsinden bir değer verir. Her ne kadar KMY'nin insandaki klinik uygulamalarında altın standartı tomografiye oranla az miktarda radyasyon yayması sebebi ile 'Dual Enerji X-ray Absorbsiyometri (DEXA)' olsa da, çeşitli nedenlerle çekilen tomografik görüntülemelerden yapılan KMY analizinin de buna eşdeğer sonuçlar verdiğini ve kırık riskini bildirmede kullanılabileceğini bildiren yayınların mevcut olduğunu bilmekteyiz [50, 61]. Hayvan deneylerindeki kemik analizlerinde ise mikrotomografi ile KMY analizi oldukça pratik uygulanabilen ve yaygın olarak tercih edilen bir yöntem olmanın yanında hem trabeküler hem de kortikal KMY verilerini verebilmesi nedeni ile çok detaylı bilgiler sağlayabilir. Pek çok araştırmacı bu pratik ve güvenilir sonuçlar veren yöntemi tercih etmektedir, çünkü DEXA ile çok küçük hayvan modellerinde boyutlar nedeni ile sağlıklı sonuçlar almak mümkün olmamaktadır [62, 63]. Son olarak da, osteointegrasyonu değerlendirmede veya sanal biyomekanik çalışmalarda kullanmak üzere de mikrotomografi görüntülemesi ve veri analizinin oldukça sık kullanılan bir yöntem olduğunu bilmek gereklidir [64-66].

Bizim çalışmamızda, mikrotomografik verilerde öncelikle defekt bölgesindeki kemik hacmi (KH), trabeküler kalınlık (TbKa) ve kemik yüzeyini (KY) inceledik. Bunun dışında defekt çevresindeki kemik dokunun kemik mineral

yoğunluğunu (KMY) ölçtük. Defekt bölgesindeki kemik oluşumunun artması ile korele olan ilk üç parametre bize defekt alanında yeni oluşmaya başlayan kemik hakkında bilgi verdi [67]. Sonuçları incelediğimizde 15 µg uygulanan 4 haftalık grupta, aynı sürede 30 µg uygulanan gruba göre anlamlı derecede kemikleşme artış olduğu görülmüş ancak bu kontrol grubuna göre istatistiksel bir fark yaratmamıştır. Kemik yüzeylerine bakıldığında ise 30 µg uygulanan 4 haftalık grubun kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha az kemikleşmeye sahip olduğu görülmektedir. Histolojik verilerde 15 µg uygulanan gruplarda da daha fazla kemikleşme olması ve mikrotomografi ve histoloji verilerimizin korele olması sebebi ile burada adrenomedüllinin kemikleşmeyi indükleyebilmiş olabileceği düşünülmüştür. Ancak 30 µg gruplarında iyileşmenin daha fazla olmaması ve bunun 8 haftalık gruplarda da 4 haftalık gruplara göre aşırı artmaması bize iki olasılığı düşündürmüştür; adrenomedüllin belli bir dozun üzerinde parathormon gibi pozitif etki etmiyor ya da bulduğumuz sonuç deneyin örnek sayısının azlığına bağlı yanıltıcı çıkmış olabilir.

Bu verilerden bağımsız olarak kemik mineral yoğunluğu sonuçlarına baktığımızda ise, kemik mineral yoğunluğunun kemik defekt bölgesindeki kemik dokularında, deney gruplarının hepsinde kontrol grubuna göre artış gösterdiğini görmekteyiz. Bu artış 15 µg grupta ise istatistiksel anlamlı çıkmaktadır. Bu sonuç defekt bölgesindeki tamir süreci ve yeni kemik yapımından bağımsız olarak adrenomedüllinin daha önceki çalışmalarda gösterilen kemik mineral yoğunluğuna pozitif yönde yaptığı etkiye bağlı gözükmektedir [4]. Yine istatistiksel anlamlı artışın 15 µg lık grupta olması ideal dozun 15 µg olabileceğini düşündürmüştür. Her ne kadar bir defekt modelinde bu artışı görmek osteoporotik bir deney hayvan modelindeki artış kadar direk ve yalın bir etkiyi göstermese de literatürde, defekt bölgesinde dansite artışına neden olabilecek başka açıklayıcı bir faktör bulunmamaktadır. Adrenomedüllin defekt bölgesinde dramatik bir yeni kemikleşme alanı yaratmasa da, KMY’de yarattığı pozitif yöndeki artışı bugüne kadar kemik üzerindeki anabolik etkilerine bağlayabiliriz.

Sanal biyomekanik analiz, oldukça maliyet-etkin ve kısa sürede uygulanabilen pratik bir yöntemdir. Gerçek biyomekanik analiz kadar sonuçları güvenilir olmasa da, özellikle hayvan deneylerinde, örneklerin çok küçük ve uygulamanın güç olduğu ve hata payının arttığı durumlarda uygulanabilir. Sonlu

eleman analizi adı verilen analiz yöntemi ile yapay zeka kullanılarak gerçek testler sanal ortamda canlandırılır ve kantitatif sonuçlar elde edilebilir [68]. Çalışmamızda, kemik defektleri yeteri kadar kapanmadığından dolayı sonlu eleman analizinde defekt bölgesi kuvvete karşı direnç gösterememiştir. Bu sebeple kemik fragmanları arasında yeterli sayıda köprüleşme oluşmadığı için sanal biyomekanik test ile incelemeyi yapamamış ve istatistik verisi elde etmemiş bulunmaktayız.

Histolojik olarak yapılan incelemede, endokondral kemikleşme beklediğimiz defekt bölgesi, masson trikrom ve hemotoksilen eozin ile boyanmıştır. Masson trikrom kıkırdak incelemelerinde de kullanıldığı gibi, endokondral yeni kemikleşme bölgelerini de kantitatif verilerle göstermekte rutin olarak kullanılmaktadır [69]. Özellikle 15 µg uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da mutlak değer olarak bakıldığında daha fazla kemikleşme görülmüştür ve bu, mikrotomografi verilerindeki kemik hacmi ve kemik mineral yoğunluğu ile de desteklenmektedir. Defekt bölgesinden elde edilen mikrotomografik verilerde özellikle trabüker kalınlık ve yeni kemik alanı/defekt bölgesi oranı korele çıkmıştır. Bu da 15 µg lık doz grubundaki bu artışın adrenomedüllinin etkisiyle yeni kemik alanı yapımını artmasına bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Yine de bu konuda kesin bir şekilde defekt üzerinde adrenomedüllinin pozitif etkisini savunmak mümkün değildir, çünkü kontrol gruplarına göre de anlamlı bir artış saptanmamış ve zaman-doz açısından bakıldığında özellikle 30 µg lık grup bu bulgu ile korele bir artış göstermemiştir.

Genel olarak hipotezimizi adrenomedüllinin kemik doku ve osteoblastlar üzerine olan anabolik etkileri üzerine kurgulasak da, son yıllarda yayınlanan ve bu etkinin gösterilemediği çalışmalardan da bahsetmek gereklidir. Martinez-Herrero ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada overektomize edilen farelerdeki bir osteoporoz modelinde adrenomedüllin inhibitörü verilen grupta beklenenin aksine daha az osteoporoz olduğu raporlanmıştır [70]. Yine Çin'de yayınlanan bir başka çalışmada idiyopatik osteoporoz hastalarında serum adrenomedüllin seviyeleri yüksek bulunmuş, ancak yazarlar yüksek adrenomedüllin seviyesinin mi osteoporozu yol açtığı ya da osteoporoz nedeni ile sekonder olarak mı adrenomedüllinin yükseldiği konusunda bir görüş bildirememişlerdir [71]. Adrenomedüllin (22-52) fragmanının kullanıldığı bir başka çalışmada artrit modeli uygulanan farelerde, artritteki inflamasyonun ve eklem çevresindeki inflamasyona bağlı kemik rezorbsiyonunun azaldığı görülmüştür [22].

Ancak yine bazı yazarlar bunun adrenomedüllinin 22-52 fragmanının aslında adrenomedüllin inhibisyonu yapmasına bağlamış ve literatürün tersi bir görüş öne sürmüşlerdir [70]. Siclari ve ark. tarafından yapılan bir başka çalışmada da Martinez-Herrero ve ark. kullandığı aynı adrenomedüllin inhibitörü ile tümöre bağlı osteolizisin azaldığı gösterilmiştir [72]. Başka bir klinik çalışmada ise adrenomedullin geninde insanlarda çok sık rastlanan bir polimorfizm olduğu ve bu polimorfizm nedeni ile daha az serum adrenomedullin seviyelerine sahip insanlarda daha az kansere rastlanıldığına dair çalışmalar bile mevcuttur [73, 74]. Özetle, adrenomedüllinin kemik dokuya olan etkileri genellikle anabolik olarak pek çok çalışmada belirtilmişse de, aksine iddia eden azımsanmayacak sayıda çalışma da mevcuttur. Bu yorum farklılıkları Adrenomedullin (22-52) fragmanın inhibitör mü yoksa agonistik mi olduğu gibi yorum farklılıklarında da kaynaklanıyor olabilir. Yine de mekanizması tam olarak bilinmeyen bu peptid hormonunun tam olarak ne yönde etki ettiğine dair kesin yargılardan şu anda kaçınmak ve yeni çalışmalarını beklemek daha isabetli bir karar olacaktır.

Çalışmamızın kısıtlılıkları mevcuttur. Öncelikle hayvan deneyi olması sebebi ile insanlardaki koşulları canlandırmak teorik olarak mümkün değildir. İkinci bir faktör, örnek sayısının hayvan deneyleri etik kuralları gereği minimumda tutulması nedeniyle az sayıda örnek ile çalışılmasıdır. Bunun dışında çalışmamızdaki deney metodumuzdan bahsetmemiz gerekir. Önkol segmental kemik defekti kullanmamız literatüre uygun ve maliyet-etkin bir defekt modeli olarak bilinmekte ve pek çok çalışmada başarıyla kullanılmıştır. Sıçanların pronasyon-supinasyon hareketlerinin olmayışı ve önkolda radius ve ulna arasında sinkondrotik bir ilişki oluşu sebebi ile fiksasyon ihtiyacının olmaması bu deney modelini oldukça kolay uygulanabilir ve ekonomik kılmaktadır. Ancak kemiğin iyileşme sürecinde mekanik stimulusun iyileşmeye katkı sağladığı düşünüldüğünde, önkol ağırlık taşıyan bir kemik segmenti olmadığı için bu etkiden yoksun olduğu düşünülebilir [75]. Ayrıca her ne kadar fiksasyona ihtiyaç duyulmaması görüşü hakim olsa da, bu görüşün genel olarak deney hayvanlarında kullanılan küçük memeli hayvanların yüksek rejenerasyon kapasitesine bağlı olduğu ve temelde fiksasyon ile yapılan deneylerin daha objektif olup olmayacağı da literatürde bir soru işareti olarak kalmaktadır. Genel olarak femur ve tibiada yapılacak segmental defektlerin fiksasyon aletleri ile (sıçan

eksternal fiksator veya plakları vb.) fikse edilerek kurgulanan deneyler daha güvenilir olarak kabul edilebilir. Ancak bu implantların yüksek maliyetleri deneyi gerçekleştirmek mali sorunlar yaratmakta ve hayvanların morbiditesini yükseltmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmamızda adrenomedüllin hormonunun kemik defekti üzerine düşündüğümüz etkiyi kısmen belli bir dozda yaptığını gördük. Hipotezimizde beklediğimiz kadar bir iyileşme görmememiz, gerek hayvan deneyinin doğasındaki kısıtlılıklardan gerekse de adrenomedüllinin tek başına segmental bir defekti dolduracak kadar bir etki kapasitesinin olmamasından kaynaklanıyor olabilir.

Her ne kadar bu deneyde adrenomedüllin segmental bir kemik defektini tek başına kapatacak etki göstermese de mikrotomografik ve histolojik bazı bulgular belli dozda adrenomedüllinin literatür ile uyumlu olabilecek şekilde kemik dokuyu indükleyebileceği fikrini desteklemektedir. Özellikle kemik mineral yoğunluğunun da deney grubunda fazla olması literatür ile uyumludur. Adrenomedüllinin de içinde olduğu kalsitonin grubu peptid hormonların, kemik fizyolojisinde anahtar rol oynayabilecek ve ileride tedavi stratejilerini değiştirebilecek etkilerinin araştırılması konusunda daha fazla mesafe kat edilmesi gerekmektedir. Bugün literatüre yaptığımız bu küçük katkı, zihnimizde başka soru işaretleri yaratmıştır: Acaba adrenomedüllin tek başına kemik dokuda büyük etkiler yapmamakta mıdır? Yoksa bilmediğimiz bir mekanizma ile kalsitonin ailesiyle beraber sinerjistik bir etkisi mi vardır? Daha büyük kemik (femur vb) kırık ve defekt modellemelerinde fiksasyon ile birlikte nasıl bir etki gösterecektir? Stres anlarında veya kafa travmalı hastalarda yükselmesi kemik dokuda nasıl bir etki yapmaktadır? Gelecek araştırmacılar tarafından yapılacak daha ileri deneylerle bu peptid hormon grubunun etkilerinin gelecekte klinik pratiği değiştirecek bir bilgi birikimine yol açacağını düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Kitamura, K., et al., *Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993. 192(2): p. 553-60.
2. Naot, D. and J. Cornish, *The role of peptides and receptors of the calcitonin family in the regulation of bone metabolism*. *Bone*, 2008. 43(5): p. 813-8.
3. Khan, S.Q., et al., *Prognostic value of midregional pro-adrenomedullin in patients with acute myocardial infarction: the LAMP (Leicester Acute Myocardial Infarction Peptide) study*. *J Am Coll Cardiol*, 2007. 49(14): p. 1525-32.
4. Cornish, J., et al., *Systemic administration of adrenomedullin(27-52) increases bone volume and strength in male mice*. *J Endocrinol*, 2001. 170(1): p. 251-7.
5. Holstein, J.H., et al., *Erythropoietin stimulates bone formation, cell proliferation, and angiogenesis in a femoral segmental defect model in mice*. *Bone*, 2011. 49(5): p. 1037-45.
6. Muff, R., W. Born, and J.A. Fischer, *Calcitonin, calcitonin gene-related peptide, adrenomedullin and amylin: homologous peptides, separate receptors and overlapping biological actions*. *Eur J Endocrinol*, 1995. 133(1): p. 17-20.
7. Zimmermann, U., J.A. Fischer, and R. Muff, *Adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide interact with the same receptor in cultured human neuroblastoma SK-N-MC cells*. *Peptides*, 1995. 16(3): p. 421-4.
8. Li, C., N. Renz, and A. Trampuz, *Management of Periprosthetic Joint Infection*. *Hip & pelvis*, 2018. 30(3): p. 138-146.
9. McLatchie, L.M., et al., *RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor*. *Nature*, 1998. 393(6683): p. 333-9.
10. Kiriya, Y. and H. Nochi, *Role and Cytotoxicity of Amylin and Protection of Pancreatic Islet β -Cells from Amylin Cytotoxicity*. *Cells*, 2018. 7(8): p. 95.

11. Liu, Y., et al., *Adrenomedullin inhibits osteoclast differentiation through the suppression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand-induced nuclear factor-kappaB activation in glucocorticoid-induced osteoporosis.* Exp Ther Med, 2017. 14(5): p. 4009-4016.
12. Iesato, Y., et al., *Adrenomedullin: A potential therapeutic target for retinochoroidal disease.* Prog Retin Eye Res, 2016. 52: p. 112-29.
13. Dogan, A., et al., *Intravenous infusion of adrenomedullin and increase in regional cerebral blood flow and prevention of ischemic brain injury after middle cerebral artery occlusion in rats.* J Cereb Blood Flow Metab, 1997. 17(1): p. 19-25.
14. Robertson, C.L., et al., *Increased adrenomedullin in cerebrospinal fluid after traumatic brain injury in infants and children.* J Neurotrauma, 2001. 18(9): p. 861-8.
15. Demir, H., et al., *The effects of adrenomedullin in traumatic brain injury.* Peptides, 2013. 43: p. 27-31.
16. Hasbak, P., et al., *Calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin release in humans: effects of exercise and hypoxia.* Regul Pept, 2002. 108(2-3): p. 89-95.
17. Geven, C., et al., *Vascular Effects of Adrenomedullin and the Anti-Adrenomedullin Antibody Adrecizumab in Sepsis.* Shock, 2018. 50(2): p. 132-140.
18. Pavel, M.E., et al., *Adrenomedullin is a novel marker of tumor progression in neuroendocrine carcinomas.* Horm Metab Res, 2006. 38(2): p. 112-8.
19. Zhou, C., et al., *Adrenomedullin promotes intrahepatic cholangiocellular carcinoma metastasis and invasion by inducing epithelial-mesenchymal transition.* Oncology Reports, 2015. 34(2): p. 610-616.
20. Tsuchiya, K., et al., *Adrenomedullin antagonist suppresses tumor formation in renal cell carcinoma through inhibitory effects on tumor endothelial cells and endothelial progenitor mobilization.* Int J Oncol, 2010. 36(6): p. 1379-86.
21. Hu, W., et al., *Adrenomedullin attenuates interleukin-1beta-induced inflammation and apoptosis in rat Leydig cells via inhibition of NF-kappaB signaling pathway.* Exp Cell Res, 2015. 339(2): p. 220-30.

22. Ah Kioon, M.D., et al., *Adrenomedullin(22-52) combats inflammation and prevents systemic bone loss in murine collagen-induced arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2012. 64(4): p. 1069-81.
23. Cornish, J., et al., *Adrenomedullin is a potent stimulator of osteoblastic activity in vitro and in vivo*. *Am J Physiol*, 1997. 273(6 Pt 1): p. E1113-20.
24. Cornish, J. and I.R. Reid, *Effects of amylin and adrenomedullin on the skeleton*. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2001. 2(1): p. 15-24.
25. Kini, U. and B.N. Nandeesh, *Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism*, in *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging*, I. Fogelman, G. Gnanasegaran, and H. van der Wall, Editors. 2012, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 29-57.
26. Mackie, E.J., *Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003. 35(9): p. 1301-5.
27. Xu, H., et al., *Role of Wnt signaling in fracture healing*. *BMB reports*, 2014. 47(12): p. 666-672.
28. Boyle, W.J., W.S. Simonet, and D.L. Lacey, *Osteoclast differentiation and activation*. *Nature*, 2003. 423(6937): p. 337-42.
29. Morrison, J.I., et al., *Salamander limb regeneration involves the activation of a multipotent skeletal muscle satellite cell population*. *The Journal of cell biology*, 2006. 172(3): p. 433-440.
30. Marquez-Lara, A., et al., *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Bone-Healing: A Systematic Review of Research Quality*. *JBJS Rev*, 2016. 4(3).
31. Boyce, B.F. and L. Xing, *Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin*. *Arthritis Res Ther*, 2007. 9 Suppl 1: p. S1.
32. Gerstenfeld, L.C., et al., *Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis*. *J Histochem Cytochem*, 2006. 54(11): p. 1215-28.
33. Gerstenfeld, L.C., et al., *Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation*. *J Cell Biochem*, 2003. 88(5): p. 873-84.
34. Barnes, G.L., et al., *Growth factor regulation of fracture repair*. *J Bone Miner Res*, 1999. 14(11): p. 1805-15.

35. Marsell, R. and T.A. Einhorn, *The biology of fracture healing*. Injury, 2011. 42(6): p. 551-555.
36. Dimitriou, R., E. Tsiridis, and P.V. Giannoudis, *Current concepts of molecular aspects of bone healing*. Injury, 2005. 36(12): p. 1392-404.
37. Shapiro, F., *Cortical bone repair. The relationship of the lacunar-canalicular system and intercellular gap junctions to the repair process*. J Bone Joint Surg Am, 1988. 70(7): p. 1067-81.
38. Kaderly, R.E., *Primary bone healing*. Semin Vet Med Surg (Small Anim), 1991. 6(1): p. 21-5.
39. Verrier, S., et al., *Tissue engineering and regenerative approaches to improving the healing of large bone defects*. Eur Cell Mater, 2016. 32: p. 87-110.
40. Daculsi, G., et al., *Osteoconduction, Osteogenicity, Osteoinduction, what are the fundamental properties for a smart bone substitutes*. IRBM, 2013. 34(4): p. 346-348.
41. Muschler, G.F., et al., *The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine*. Tissue Eng Part B Rev, 2010. 16(1): p. 123-45.
42. Alper, G., et al., *Osteogenesis in bone defects in rats: the effects of hydroxyapatite and demineralized bone matrix*. Am J Med Sci, 1989. 298(6): p. 371-6.
43. Kim, H.Y., et al., *An exploratory study of gold wire implantation at acupoints to accelerate ulnar fracture healing in rats*. J Physiol Sci, 2009. 59(4): p. 329-33.
44. Turhan, E., et al., *A comparison of the effects of platelet-rich plasma and demineralized bone matrix on critical bone defects: An experimental study on rats*. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg, 2017. 23(2): p. 91-99.
45. Sun, J.S., et al., *Vitamin-D binding protein does not enhance healing in rat bone defects: a pilot study*. Clin Orthop Relat Res, 2009. 467(12): p. 3156-64.
46. Oztürk, A., et al., *Demineralized bone matrix and hydroxyapatite/tri-calcium phosphate mixture for bone healing in rats*. International orthopaedics, 2006. 30(3): p. 147-152.

47. Kim, J.-H. and H.-W. Kim, *Rat defect models for bone grafts and tissue engineered bone constructs*. Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2013. 10(6): p. 310-316.
48. Boivin, G.P., et al., *Review of CO₂ as a Euthanasia Agent for Laboratory Rats and Mice*. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS, 2017. 56(5): p. 491-499.
49. Kan, B., et al., *Histomorphometric and microtomographic evaluation of the effects of hyperbaric oxygen and systemic ozone, used alone and in combination, on calvarial defect healing in rats*. J Oral Maxillofac Surg, 2015. 73(6): p. 1231.e1-10.
50. Pickhardt, P., et al., *Opportunistic screening for osteoporosis using abdominal computed tomography scans obtained for other indications*. Ann Intern Med, 2013. 158: p. 588-595.
51. Liu, J., et al., *Repair of bone defects in rat radii with a composite of allogeneic adipose-derived stem cells and heterogeneous deproteinized bone*. Stem Cell Res Ther, 2018. 9(1): p. 79.
52. Zhang, M., et al., *Repair of segmental long bone defect in a rabbit radius nonunion model: comparison of cylindrical porous titanium and hydroxyapatite scaffolds*. Artif Organs, 2014. 38(6): p. 493-502.
53. Bennett, P.M., et al., *Preclinical therapies to prevent or treat fracture non-union: A systematic review*. PloS one, 2018. 13(8): p. e0201077-e0201077.
54. Cornish, J. and D. Naot, *Amylin and adrenomedullin: novel regulators of bone growth*. Curr Pharm Des, 2002. 8(23): p. 2009-21.
55. Nair, A.B. and S. Jacob, *A simple practice guide for dose conversion between animals and human*. J Basic Clin Pharm, 2016. 7(2): p. 27-31.
56. Freireich, E.J., et al., *Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man*. Cancer Chemother Rep, 1966. 50(4): p. 219-44.
57. Tawonsawatruk, T., D.F. Hamilton, and A.H. Simpson, *Validation of the use of radiographic fracture-healing scores in a small animal model*. J Orthop Res, 2014. 32(9): p. 1117-9.

58. Morgan, E.F., et al., *Micro-computed tomography assessment of fracture healing: relationships among callus structure, composition, and mechanical function*. Bone, 2009. 44(2): p. 335-44.
59. Campbell, G.M. and A. Sophocleous, *Quantitative analysis of bone and soft tissue by micro-computed tomography: applications to ex vivo and in vivo studies*. Bonekey Rep, 2014. 3: p. 564.
60. Wu, Y., S. Adeeb, and M.R. Doschak, *Using Micro-CT Derived Bone Microarchitecture to Analyze Bone Stiffness - A Case Study on Osteoporosis Rat Bone*. Front Endocrinol (Lausanne), 2015. 6: p. 80.
61. Schreiber, J., et al., *Hounsfield units for assessing bone mineral density and strength: a tool for osteoporosis management*. J Bone Joint Surg Am, 2011. 93: p. 1057-1063.
62. Zeitoun, D., et al., *Microcomputed tomography of the femur of diabetic rats: alterations of trabecular and cortical bone microarchitecture and vasculature—a feasibility study*. European Radiology Experimental, 2019. 3(1): p. 17.
63. Mashiatulla, M., R.D. Ross, and D.R. Sumner, *Validation of cortical bone mineral density distribution using micro-computed tomography*. Bone, 2017. 99: p. 53-61.
64. Stadelmann, V.A., et al., *In Vivo MicroCT Monitoring of Osteomyelitis in a Rat Model*. Biomed Res Int, 2015. 2015: p. 587857.
65. Bissinger, O., et al., *Comparative 3D micro-CT and 2D histomorphometry analysis of dental implant osseointegration in the maxilla of minipigs*. J Clin Periodontol, 2017. 44(4): p. 418-427.
66. He, T., et al., *A comparison of micro-CT and histomorphometry for evaluation of osseointegration of PEO-coated titanium implants in a rat model*. Scientific Reports, 2017. 7(1): p. 16270.
67. Faot, F., et al., *Micro-CT analysis of the rodent jaw bone micro-architecture: A systematic review*. Bone Reports, 2015. 2: p. 14-24.
68. Torcasio, A., et al., *Use of micro-CT-based finite element analysis to accurately quantify peri-implant bone strains: a validation in rat tibiae*. Biomech Model Mechanobiol, 2012. 11(5): p. 743-50.

69. Rentsch, C., et al., *Comprehensive histological evaluation of bone implants*. Biomatter, 2014. 4: p. e27993.
70. Martínez-Herrero, S., et al., *Prevention of Bone Loss in a Model of Postmenopausal Osteoporosis through Adrenomedullin Inhibition*. Frontiers in physiology, 2016. 7: p. 280-280.
71. Lin, J., C. Lu, and L. Gao, *[Study on the level of plasma calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin in subjects with primary osteoporosis]*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2001. 81(14): p. 841-3.
72. Siclari, V.A., et al., *Tumor-expressed adrenomedullin accelerates breast cancer bone metastasis*. Breast Cancer Res, 2014. 16(6): p. 458.
73. Cheung, B.M., et al., *Plasma adrenomedullin level is related to a single nucleotide polymorphism in the adrenomedullin gene*. Eur J Endocrinol, 2011. 165(4): p. 571-7.
74. Martinez-Herrero, S. and A. Martinez, *Cancer protection elicited by a single nucleotide polymorphism close to the adrenomedullin gene*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. 98(4): p. E807-10.
75. Mehta, M., et al., *In vivo tracking of segmental bone defect healing reveals that callus patterning is related to early mechanical stimuli*. Eur Cell Mater, 2012. 24: p. 358-71; discussion 371.