



Nitrik oksitin kemik iyileşmesi üzerine olan etkisinin radyolojik incelenmesi: Sıçanlarda deneysel çalışma

Radiographic evaluation of the effect of nitric oxide on bone healing: an experimental study

Yasemin BALDIK,¹ Ufuk TALU,² Levent ALTINEL,² Hatice BİLGE,³ Gülçin Aykaç TOKER¹

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, ¹Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı,

²Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, ³Onkoloji Enstitüsü

Amaç: Nitrik oksitin (NO) kemik iyileşmesi üzerindeki etkisi araştırıldı.

Çalışma planı: Erişkin ve aynı yaşta 20 adet Sprague-Dawley türü sıçanın femurlarında kritik büyüklükte segmental defekt modeli kullanıldı. Diafiz ortasında diafiz çapının yaklaşık iki katı büyüklüğünde (5 mm) standart defekt oluşturuldu. 23x3x4 mm boyutunda polietilen plak ve 1.2 mm çaplı piva çivileriyle stabil osteosentez yapıldı. Defekt bölgesi greftlenmesinde kontrol grubunda aynı tür sıçanın femur ve tibialarından elde edilen demineralize kemik matriksi (DKM), deney grubunda ise NO'nun depo şekli gibi davranan nitrozoalbumin ile muamele edilen DKM kullanıldı. Ameliyattan sonra 1, 3, 5, 6 ve 10. haftalarda yapılan radyolojik değerlendirmelerde kallus oluşumu ve kaynama üç ayrı gözlemci tarafından değerlendirildi.

Sonuçlar: Radyolojik değerlendirmede gözlemciler arası güvenilirlik için korrelasyon katsayısı anlamlı ($r=0.97$) bulundu. Onuncu haftada kontrol grubunda hiçbir hayvanda %100 kallus oluşumu ve kaynama görülmezken, deney grubunda iki hayvanda %100'e yakın kallus oluşumu, altı hayvanda kaynama gözlemlendi. Yeni kemik oluşumu görülen ortalama defekt alanı kontrol grubunda %43, deney grubunda %83 bulundu. Her iki gruptaki kemik oluşumuna ait veriler değişkenlerin parametrik olmayan analizi (Kruskal-Wallis H Testi) yöntemiyle değerlendirildi ve fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.022$).

Çıkarımlar: Kırık iyileşmesinin erken döneminde ortama verilen NO'nun iyileşmeyi ve yeni kemik oluşumunu olumlu yönde etkilediği görüldü.

Anahtar sözcükler: Anjiogenez, fizyolojik; hayvan; apoptosis/fizyoloji; kemik; kemik rejenerasyonu/fizyoloji; nitrik oksit/fizyoloji; osteogenez/fizyoloji.

Objectives: We investigated the effect of nitric oxide (NO) on bone formation and healing.

Methods: Twenty adult Sprague-Dawley rats were used in a critical-size, segmental femoral defect model. A standard 5 mm segmental defect, approximately twice the diameter of the diaphysis, was created in the middle of the shaft. A polyethylene plate (23x3x4 mm) and L3-size postdental screws (1.2 mm in diameter) were used for rigid fixation. The defect was grafted using demineralized rat-bone (femur and tibia) matrix (DBM) in the control group, and DBM treated with nitrosoalbumin (an active NO congener) in the study group. Serial radiographs were obtained at 1, 3, 5, 6, and 10 weeks postoperatively. Bone formation and union were scored by three independent observers.

Results: The interobserver reliability study for radiographic scoring yielded an intraclass correlation coefficient of $r=0.97$. At the end of the 10th postoperative week none of the rats in the control group had 100% callus formation and union, whereas nearly 100% callus formation and union were observed in two and six study animals, respectively. Similarly, the calculated median values for the defect area occupied by new bone were 43% and 83% in the control and study groups, respectively. Analysis of data on bone formation showed a statistically significant difference between the two groups (Kruskal-Wallis H test, $p=0.022$).

Conclusion: Significant difference in radiologic results suggest that NO may promote healing and new bone formation when given in the early phase of bone healing.

Key words: Angiogenesis, physiologic; animal; apoptosis/physiology; bone; bone regeneration/physiology; nitric oxide/physiology; osteogenesis/physiology.

Kemik oluşumu, dayanıklılığı ve rejenerasyonu çok sayıda sistemik ve lokal düzenleyicilere (regülatörler) bağlı olan ve hücrel yapıların karşılıklı etkileşimini içeren karmaşık bir süreçtir. Büyüme ve farklılaşma faktörleri, hormonlar, sitokinler ve ekstraselüler matriks bileşenleri bu düzenleyicilerden bazılarıdır.^[1]

Son yıllarda yapılan çalışmalar L-argininden nitrik oksit sentaz (NOS) katalizi ile sentezlenen ve çok fonksiyonlu bir haberci molekül olan nitrik oksit (NO) bu düzenleyicilerle etkileşim halinde olduğunu ve kemik metabolizmasında önemli rol oynadığını göstermektedir.^[1-5]

Nitrik oksit kemik hücrelerinin aktivitesi için önemli bir otokrin ve parakrin mediatördür. Sitokin aktivasyonu, östrojen ve mekanik stres gibi çeşitli uyaranlara yanıt olarak üretilir. Nitrik oksit hem osteoblast hem de osteoklast serileri üzerine biyolojik etkileri vardır. Sitokinle indüklenen indüklenebilir NOS (iNOS) katalizi ile sentezlenen NO yüksek konsantrasyonda, in vitro modellerde osteoklastik kemik rezorpsiyonuna güçlü inhibitör etki gösterir. Buna karşın, yapısal NOS (cNOS) katalizi ile sentezlenen düşük konsantrasyondaki NO normal osteoklast fonksiyonu için gerekli gibi görünmektedir. Nitrik oksit kemik yapımı ve osteoblast fonksiyonlarına etkisi daha az bilinmektedir. Nitrik oksit yapısal üretimi osteoblastların büyümesi ve sitokin üretmesi için otokrin uyaran gibi rol oynar.^[2] Ayrıca NO'nun mekanik stimülasyona bağlı kemik oluşumunda erken mediatör olduğu gösterilmiştir.^[3] Nitrik oksit enflamatuar yanıtın bir parçası olarak yara ve tendon iyileşmesinde de rol oynadığına ilişkin yayınlar vardır.

Çalışmamızda, yara iyileşmesi ve kemik metabolizmasında ortak mekanizmalar içeren ve çok yönlü rolü olan NO'nun, kırık iyileşmesinin erken döneminde ortama eklendiğinde iyileşmeye ve yeni kemik oluşumuna etkisi araştırıldı.

Gereç ve yöntem

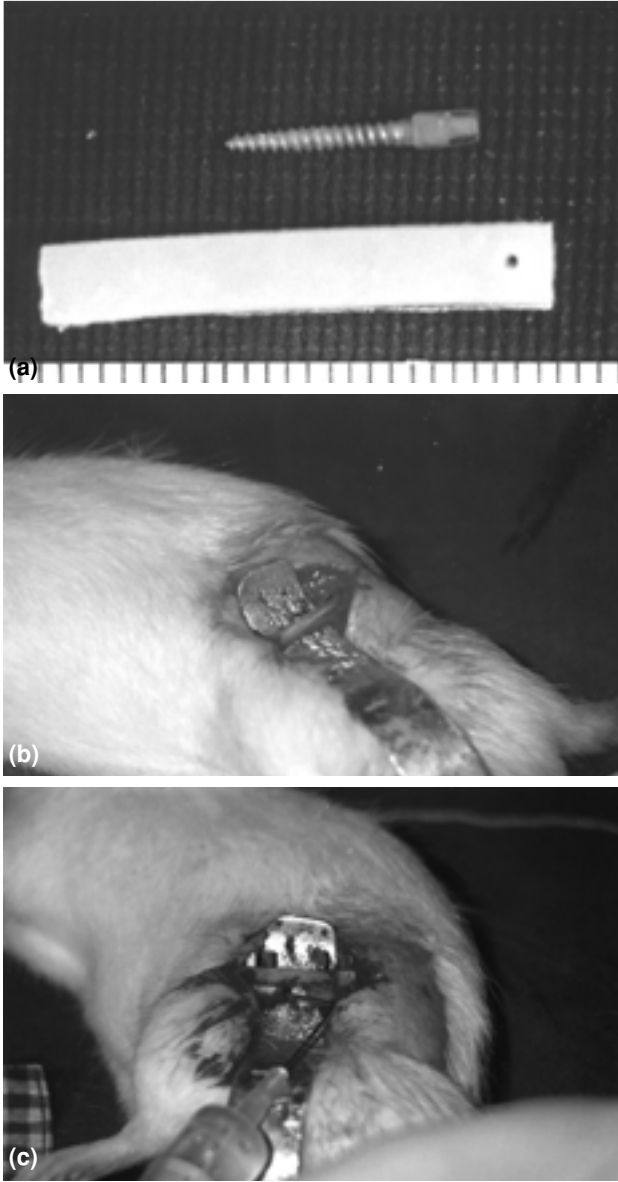
Deney hayvanları: Çalışmamızda ağırlıkları 340-370 gr arasında değişen, aynı yaşta (5-6 aylık) 20 adet erişkin erkek Sprague-Dawley türü sıçan kullanıldı. Ameliyat öncesinde beşli kafeslerde bulunan hayvanlar ameliyat sonrasında 10 gün boyunca tekli kafeslerde izlendi ve daha sonra yine beşli kafeslere alındı. Bu sürede standart kemirgen yemi

ve musluk suyu ad libitum ile beslendiler. Deney süresince hiçbir aktivite ve yük kısıtlaması yapılmadı.

İmplant materyali: Sıçanların tümünde oluşturduğumuz femoral defekt bölgesini greftlemek amacıyla kullandığımız demineralize kemik matriksi (DKM), deney grubunu oluşturan hayvanlarla eş yaş ve ağırlıkta olan Sprague-Dawley erkek sıçanların femur ve tibialarından, Bolander ve Balian'ın^[6] kullandığı standart yöntemle, İstanbul Tıp Fakültesi, Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında elde edildi. Matriksi oluşturan demineralize kemik partiküllerinin boyutları 100µm-750µm arasındaydı. Greft için eşdeğer hacim ve ortam sağlamak amacıyla 10 mg DKM, önceden küçültülmüş, eşit ağırlıkta (32mg) 3 numara, renksiz jelatin ilaç kapsüllerinin içine yerleştirildi ve greftleme yapılana kadar -80°C de saklandı.

Cerrahi model: Çalışmamızda daha önce geliştirilip tanımlanan, sıçan femurunda kritik büyüklükte segmental defekt modeli kullanıldı.^[7,8] Bu model benzer çalışmalarda olduğu gibi, çalışmamızı kolaylaştıran ve güvenilir kılan bazı kriterleri taşımaktadır. Öncelikle hiçbir tedavi uygulanmadığı taktirde en az %90 oranında kaynamama ile sonuçlanmaktadır. İkinci olarak, standart bir defekt oluşturulduğu için kemik oluşumunu belirlemek üzere, güvenilir ve kolay bir biçimde ardışık gözlemler ve radyolojik ölçümler yapılabilir. Üçüncü olarak, plak-vida osteosentezinin sağladığı rijid tesbit zemininde defekt boyutunu ve kemik uçlarının tüm düzlemlerdeki konumunu ve aksiyal ilişkisini korumak mümkün olmuştur. Son olarak, bu model DKM içeren jelatin kapsülün defekt içine stabil ve uyumlu bir şekilde yerleştirilmesi için uygun şartları sağlamaktadır.

Cerrahi işlem: Genel anestezi için tüm sıçanlarda kas içi (İM) ketamin (10 mg/100 gr vücut ağırlığı) ve xylazine (0.25 mg/100 mg vücut ağırlığı) kullanıldı. Ameliyat sonrası enfeksiyona karşı tüm hayvanlara İM prokain penisilin G (60.000 İ.Ü.) verildi. İnsizyon bölgesinin temizliği sağlandıktan sonra lateral yaklaşımla femura ulaşıldı. Tüm femur diafizi subperiostal diseksiyon kullanılarak, çevreleyen kas ve periosttan arındırılmış şekilde ortaya kondu. Vida yerleri önceden hazırlanmış 23x3x4 mm boyutlarında polietilen plak femur ön korteksine adapte edildi. Tesbit için diş hekimliğinde kullanılan 9 mm uzunluğunda, 1.2 mm çapında piva çivisi (L3 size post-dental screw) kullanıldı. Burr kullanılarak diafiz or-



Şekil 1. Deneyde kullanılan kemik tesbit araçları ve cerrahi model. **(a)** 23x3x4 mm boyutlarındaki polietilen plak ve 1.2 mm çaplı piva çivisi. **(b)** Çevreleyen kas ve periosttan arındırılmış şekilde, tüm femur cisminin ortaya konulması. **(c)** Plak-vida osteosentezi sonrasında segmental defekt görülüyor. Greft yerleştirilmeden önce basınçlı yıkama yapılarak, proksimal ve distal medüller kanaldaki kemik iliğinin uzaklaştırılması.

tasında cetvel eşliğinde, diafiz çapının yaklaşık iki katı (5 mm) uzunluğunda segmental defekt oluşturuldu. Kemik iliğindeki osteoprogenitör hücrelerin kontrol edilemeyecek etkileşimini engellemek amacıyla, basınçlı serum fizyolojik irrigasyonu yapılarak, proksimal ve distal medüller kanaldaki kemik

iliği uzaklaştırıldı. İmplant materyali defekt bölgesine yerleştirilerek insizyon katlarına uygun şekilde, kromik katgüt kullanılarak kapatıldı (Şekil 1).

DeneySEL model: Yirmi sıçan iki eşit gruba ayrıldı. Deney grubunu oluşturan sıçanlarda implant materyali, implantasyondan hemen önce 0.006 mM nitrozoalbumin içeren 50 µl, pH=7.4 olan 0.2M potasyum fosfat tamponu ile muamele edildi. Nitrik oksit, tiol içeren proteinlere bağlanarak s-nitrozoproteinleri (S-NP) oluşturur. S-NP'ler NO'nun biyolojik aktif formudur ve NO'dan daha stabildir. Böylece aktif mediatörün depo şekli gibi davranırlar.^[9] Deney grubunda kullandığımız nitrozoalbumin S-NP'lere bir örnektir ve laboratuvarımızda Ewing ve ark.^[10] tarafından belirlenen yöntemle sentezlenmiştir. Kontrol grubunda ise aynı işlem sadece 50 µl, pH=7.4 olan 0.2M potasyum fosfat tamponu ile yapıldı. Böylece deney grubunda defekt ortamına bir NO donörü olan nitrozoalbumin katıldı. Defekt bölgesindeki iyileşme ve kemik oluşumu seri radyografik incelemelerle izlendi.

Radyografik analiz: Radyografik değerlendirme için sıçanlar eter solutularak uyutuldu. Yüzükoyun pozisyonunda flasterle yapııştırıldı ve arka ekstremitelerine tam ve simetrik dış rotasyon pozisyonu verildi. Bu şekilde 1, 3, 5, 6 ve 10. postoperatif haftalarda her iki femurun seri radyografileri alındı. Radyografilerin çekiminde Mecaserta Simics röntgen cihazı kullanıldı. Tüp mesafesi ve kullanılan enerji seviyesi (92 cm-40 kV, 100 mA, 0.03 sn) sabitlendi. Defekt bölgesindeki yeni kemik oluşumunu değerlendirmek için, Yasko ve ark.^[7] tarafından geliştirilen altı aşamalı skorlama sistemi kullanıldı. Buna göre, hiç kemik oluşmaması durumunda 0, defekt bölgesinin %25'inden az kemik oluşumu için 1, %25-50 arasında kemik oluşumu için 2, %50-75 arasında kemik oluşumu için 3, %75'ten fazla kemik oluşumu için 4 ve %100 kemik oluşumu için 5 puan verildi. Radyolojik olarak femur çapının %25 veya daha fazlasında kemiksel devamlılığın sağlanması kaynama olarak kabul edildi. Radyolojik değerlendirmenin güvenilirliğini artırmak için çalışmada yer almayan üç ayrı uzman gözlemciye birbirinden bağımsız değerlendirme yaptırıldı.

Sonuçlar

Ameliyat sonrasında, ertesi sabah ölü bulunan kontrol grubundan bir hayvan ile, ilk hafta içinde derin enfeksiyon gelişen deney grubundan bir hayvan

Tablo 1. Üç bağımsız gözlemcinin ortalama radyolojik değerlendirme skorları

Zaman (hafta)	1		3.5		6		10	
Grup Hayvan	Kontrol	Deney	Kontrol	Deney	Kontrol	Deney	Kontrol	Deney
# 1	0	0	0	1	2	3	3	4
# 2	0	0	0	1	1	2	3	5
# 3	0	0	0	0	1	4	3	5
# 4	0	0	0	0	2	2	3	3
# 5	0	0	0	1	3	4	3	5
# 6	0	0	0	3	1	3	1	4
# 7	0	0	0	5	1	5	3	5
# 8	0	0	0	1	2	2	3	5
# 9	0	0	1	1	1	2	2	2
#10	0	0	0	2	2	5	3	5
Kemik oluşumu görülen ortalama defekt alanı							%43	%83

değerlendirme dışı bırakıldı ve yenileriyle replase edildi. Yine kontrol grubunda bir hayvanda proksimal femurdaki vidalar çevresinde 3_{1/2} haftada radyolüsan hatlar görüldü; ancak takip süresince bu hayvanda ve diğerlerinde implant yetersizliği gelişmedi.

Radyolojik değerlendirme: Üç bağımsız gözlemcinin kontrol ve deney grubuna ait radyolojik değerlendirme skorları Tablo 1’de görülmektedir. Onuncu hafta sonunda değişik derecelerde de olsa, kontrol ve deney grubundaki tüm hayvanlarda, osteotomi hattında reaktif kemik oluşumu saptandı. Kemik oluşumu, çoğunda plağın karşı tarafındaydı. Birinci haftada kontrol ve deney grubunda hiçbir hayvanda reaktif kemik oluşumu saptanmadı; 3_{1/2} haftada ise kontrol grubunda sadece bir hayvanda %25’ten az kemik oluşumu saptanırken, deney grubunun yarıdan fazlasında değişik derecelerde kemik oluşumu, bir hayvanda ise tam kaynama gözlemlendi (Şekil 2). Onuncu haftada kontrol grubunda hiçbir hayvanda %100 kallus oluşumu ve kaynama görülmezken, deney grubunda iki hayvanda %100’e

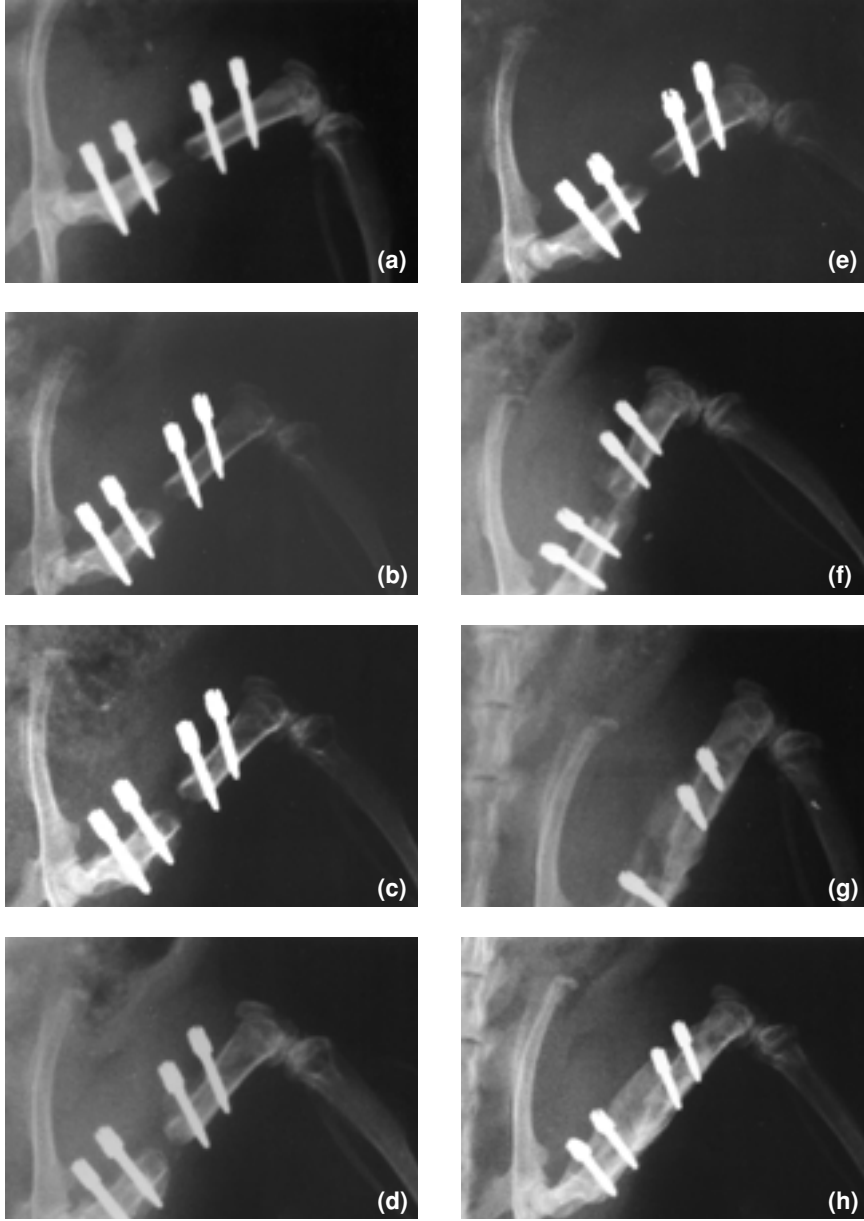
yakın kallus oluşumu, altı hayvanda kaynama gözlemlendi (Tablo 2). Onuncu hafta sonunda yeni kemik oluşumu görülen ortalama defekt alanı kontrol grubunda %43, deney grubunda %83 bulundu. Radyolojik skorlamada gözlemcilerarası güvenilirlik korelasyon katsayısı anlamlı ($r=0.97$) bulundu. Özellikle 6. ve 10. haftalarda kontrol ve deney grubu arasında belirgin derecede iyileşme farkı gözlemlendi. Her iki grupta 10. haftadaki kemik oluşumuna ait veriler değişkenlerin parametrik olmayan analizi (Kruskal-Wallis H Testi) yöntemiyle değerlendirildi ve fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.022$).

Tartışma

Kırık iyileşmesi enflamasyon, tamir (proliferasyon) ve remodelizasyon aşamaları sonrasında travmatize kemiğin orijinal hale dönmesi olarak tanımlanabilir. Özellikle bir uzun kemik kırığının problemsiz şekilde iyileşmesi birçok değişik faktöre bağlıdır. Kırık iyileşmesi çok sayıda sistemik ve lokal düzenleyicilerle (regülatörler), hücrel yapıların karşılıklı etkileşimini içeren karmaşık bir süreçtir. Moleküler ve hücrel mekanizmalar tam olarak açıklığa kavuşmamasına rağmen, ortak noktalar ve mekanizmalar içeren yara ve kırık iyileşmesinde NO’nun erken enflamatuvar dönemde rol oynadığı saptanmıştır. Nitrik oksit, L-argininden NOS katalizi ile sentezlenir. Shearer ve ark.nın^[11] geliştirdiği, yara iyileşmesinde NO’nun pulsatif modeline göre, polimorf nüveli lökositler (PNL) yarada arginin metabolizmasını başlatırlar. Polimorf nüveli lökositler

Tablo 2. Haftalara göre radyolojik olarak kaynamayla sonuçlanan defekt ve hayvan sayısı

Zaman (hafta)	Kontrol grubu	Deney grubu
1 hafta	0 / 10	0 / 10
3.5 hafta	0 / 10	1 / 10
6 hafta	0 / 10	2 / 10
10 hafta	0 / 10	6 / 10
<i>Toplam</i>	0	6 / 10 (%60)



Şekil 2. Ameliyat sonrasında segmental defektlerin iyileşme aşamalarını gösteren ardışık radyografiler.

Kontrol grubundan 6 no'lu hayvan. **(a)** Birinci haftada kemik oluşumu yok. **(b)** 3.5 haftada yine kemik oluşumu gözlenmiyor. **(c)** Altıncı haftada %25'ten az kemik oluşumu var. **(d)** Onuncu haftada kemik oluşumu halen %25'in altında. Kaynama yok.

Deney grubundan 7 no'lu hayvan. **(e)** Birinci haftada kemik oluşumu yok. **(f)** 3.5 hafta. Defekt alanının tümünde kemik oluşumu görülüyor. **(g)** Altıncı haftada kallus çok daha belirgin. **(h)** Onuncu haftada %100 kemik oluşumu ve kaynama görülmekte.

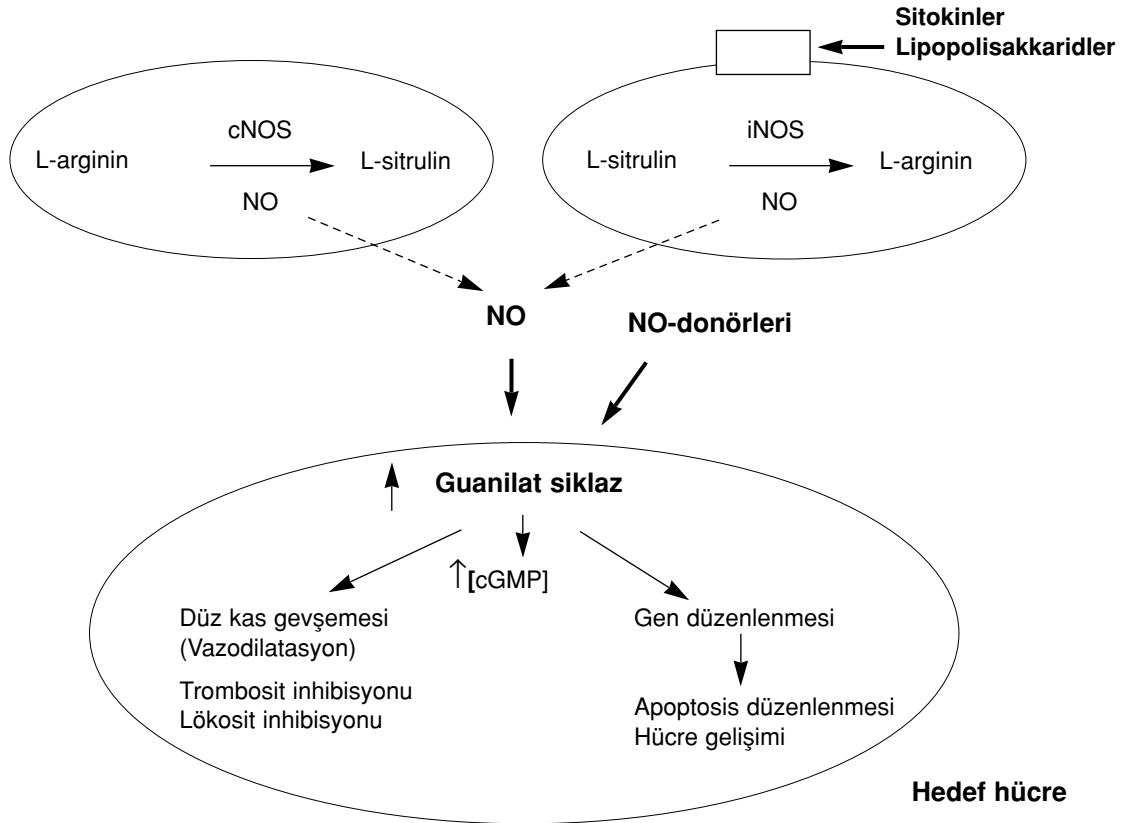
de L-argininden NOS katalizi ile üretilen NO, enflamatuar fazın (ilk üç gün) karakteristik bazı olaylarına mediatörlük yapar. Bu olaylara örnek olarak mikrobiyositoz, vazodilatasyon, trombosit agregasyon inhibisyonu gösterilebilir. Yara iyileşmesi devam ederken NO apoptotik etkisiyle PNL'nin ölümüne ve lizisine yol açar. Böylece bir çeşit otokontrol mekanizmayla yaranın PNL tarafından infiltrasyonu ve NO yapım kaynağı azalır. Nitrik asit prekürsörü olan L-arginin, yara sıvısında konsantrasyonu düşen tek amino asittir ve yara iyileşmesinin erken döneminde (ilk üç gün) ortamda NO yapımı baskındır.^[11] Nitrik oksitin enflamatuar yanıtındaki rolünü ortaya koyan

başka çalışmalar da mevcuttur. L-arginin kilo değişiklikleri, nitrojen dengesi ve yara iyileşmesi gibi olaylarda önemli rol oynar. Argininsiz diyetle beslenen sıçanlarda, yarada kollajen birikimi azalmakta ve yara iyileşmesi bozulmaktadır.^[12] Benzer şekilde, NO sentezinin sistemik inhibisyonu yara ve tendon iyileşmesini bozmaktadır.^[13,14] Gerçekten de deneysel olarak oluşturulan yara iyileşmesinin bozulduğu klinik tablolarda (örneğin diabetes mellitus ve protein kalori malnütrisyonu), yarada kollajen birikimi bozulurken NO sentezi de azalmaktadır.^[13,15] Nitrik asitin, yara iyileşmesi sırasında doku hasarı ve enflamatuar cevap olmaksızın hücre popülasyonlarının

daki hızlı değişimleri kontrol eden bir mekanizma olan apoptosiz üzerine iki yönlü etkisi vardır: Endotel hücrelerinde yüksek konsantrasyonda NO pro-apoptotik etki gösterirken düşük konsantrasyonlarda anti-apoptotik etkiye sahiptir.^[16,17]

İçerdiği ortak mekanizmalar düşünüldüğünde, NO'nun yara iyileşmesi sırasında apoptosiz düzenlenmesi ve sitoprotektif genlerin indüksiyonu yönünde gösterdiği etkiler,^[18] kırık sonrası kemik iyileşmesinde de söz konusu olabilir. Kırık iyileşmesinde yaralanmadan hemen sonra başlayan enflamasyon aşamasında, trombositlerden, ölü ve hasarlı hücrelerden salınan mediatörler vazodilatasyona ve plazma eksüdasyonuna neden olur. Bu şekilde kırık bölgesinde akut ödem oluşur. Bölgeye ilk göçen enflamatuvar hücrelerden olan polimorf nüveli lökositleri makrofaj ve lenfositler takip eder. Bu hücreler, ayrıca damar oluşumunu (anjiojeniz) uyaran sitokinleri salgılar. Enflamatuvar cevabın gerilemesiyle nekrotik hücreler ve eksuda rezorbe olur ve fibroblastlar belirerek yeni bir matriks üretimine başlar.^[19]

Nitrik oksit ile ilişkili ikinci ve kanımızca daha önemli olan mekanizma ise NO'nun rol aldığı angiogenez ve normal kemik damar yapısında gözlenen NO ile ilişkili vazodilatasyondur.^[5,20,21] Fizyolojik düzeyde NO'nun damar tonusunu düzenlediği, mikrovasküler sistemi yaralanmaya karşı koruduğu düşünülmekte ve endojen NOS aktivitesinin in vivo damar oluşumu için kritik olduğu ileri sürülmektedir.^[20] Kırığın tamiri aşaması için önemli ön şartlardan biri yeterli damarsal yanıtın gelişmesidir. Bu aşamada kan akımında önemli değişiklikler gözlenir.^[22] Var olan damarlardaki vazodilatasyona veya angiogenez ve yeni damar oluşumuna bağlı olduğu düşünülen kan akımı artışının, önceleri kırık bölgesinin metabolik ihtiyacına yanıt olarak geliştiği düşünülmektedir. Bununla birlikte, endotelin bu aşamada yarı geçirgen bir bariyer olarak davrandığı ve lokal damar tonusunu ve kemik hücre fonksiyonunu etkileyen lokal faktörlerin kaynağı olduğu gösterilmiştir.^[5] Normal kemik damarlanmasında görülen NO ile ilişkili vazodilatasyonun yanı sıra iskemik kemikte de son derece güçlü vazodilatasyon etkisi saptanmış-



Şekil 1. Nitrik oksit (NO) başlıca iki farklı nitrik oksit sentaz (NOS) enzimiyle sentezlenir. Damar tonusu, trombosit ve lökosit aktivasyonu, apoptosiz gibi olayları düzenleyen, biyolojik bir araçtır.

tır. Yeni damar oluşumuna ait süreçte rol aldığı için NO'nun kallus oluşumu sırasında önceden var olan, damarların kanlanma artışı şeklindeki yanıtını ve yeni damar oluşumunu sağladığı öne sürülebilir.^[5,21] Yakın zamanlarda yayınlanan bir çalışmada, kırık sonrası erken dönemde, kırık hattına yakın bölgedeki kortikal kan damarlarında endotelial NO sentaz (eNOS) aktivitesinin belirginleştiği gösterilmiştir.^[23] Ayrıca, kırık hattında erken dönemde eNOS protein sentezi ve enzim aktivitesi artar ve sonra iyileşme aşamasında bazal seviyelere iner.^[23] Bu mekanizma ve saptamaları göz önüne alan oldukça yeni bir çalışmada kırık sonrasında kemikte, NO üzerinden gelişen damarsal bir yanıtın olup olmadığı, varsa zaman içindeki seyri ve etkinin lokal düzenlenmiş olup olmadığı araştırılmıştır. Kırık bölgesinde NO kaynaklı bir damarsal yanıtın olduğu, bunun erken iyileşme döneminde en üst düzeye çıktığı ve bu etkinin damarlar içinde NO üretilmesine bağlı lokal bir etki olduğu sonucuna varılmıştır.^[5]

Özetlenen bu mekanizmalar (Şekil 3) ve NO'nun erken dönemde kemik iyileşmesini olumlu etkileyecek bir aktiviteye sahip olabileceği hipotezi, çalışmamızın temelini oluşturmuştur. Bu hipotez çerçevesinde, segmental femur defekt modelini kullandık. Kontrol grubunda defekt bölgesini sadece DKM ile greftlerken, deney grubunda DKM'yi bir NO donoru olan nitrozoalbumin ile muamele ettik. Böylece, ortama erken dönemde, varsayılandan daha fazla NO getirmiş olduk. Yöntemin kaynamama açısından güvenilirliği sebebiyle, iki grup arasında iyileşme yönünden fark elde edildiğinde bunun oldukça anlamlı olacağını düşündük. Deneyde kullandığımız femoral segmental defekt modeli, birçok çalışmada osteoindüktif, osteokondüktif ve osteojenik faktör ve materyallerin araştırılmasında kullanılan güvenilir ve standart bir yöntemdir.^[7,8,24] Yöntem bölümünde vurguladığımız önemli avantajları sağlaması dışında, tedavi uygulanmaması durumunda bu model ile oluşturulan defektin en az %90 oranında kaynamama ile sonuçlandığı gösterilmiştir.^[7] Femurun tümünü periostundan sıyırdıktan sonra tüm anterior korteks boyunca plak ile osteosentez, diafiz ortasında femur çapının iki misli oranında ve tam kemiksel defekt içeren bu işlem sonrasında kaynamama klasik ortopedik bilgilerle uyumlu bir sonuçtur. Ayrıca plak tesbiti için kullanılan yivli Kirschner tellerinin, plak tesbiti için her zaman yeterli olmadığını; her dört hayvandan birinde, değişik derecelerde implant ye-

tersizliği ile karşılaşıldığını gözledik. Yöntemi modifiye ederek, diş hekimliğinde kullanılan piva çivileriyle son derece stabil bir osteosentez sağladık ve yöntemin mekanik açıdan güvenilirliğini artırdık. Tedavi uygulanmadığında %90 kaynamama ile sonuçlanan modelde, DKM kullanılarak greftleme yapılan kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, deney grubunda daha iyi kemik iyileşmesi ve kaynama gözlenmesi oldukça önemlidir. Gerçekten de, 3_{1/2} haftadan itibaren belirginleştiği üzere, kemiksel iyileşme ve kaynama, deney grubundaki hayvanların herbirinde ve her aşamada daha iyi ve ileri olmuştur.

Çalışmamızın başladığı ve yazıldığı dönemde yaptığımız araştırmada, nitrik oksit ortotopik bir bölgede, kemik indükleyici bir aktiviteye sahip olduğunu gösterir bir başka çalışmaya rastlamadık. Elde ettiğimiz radyolojik sonuçlar NO'nun ortotopik bir bölgede kemik indükleyici aktiviteye sahip olduğunu düşündürmektedir. Üçüncü hafta gibi erken bir dönemde, kontrol grubunda sadece bir hayvanda %25 kallus oluşumu gözlenirken, deney grubundaki sekiz hayvanda en az %25, birinde %75 ve bir diğerinde ise %100 oranında kemik oluşumu ve kaynama gözlenmiştir. Bu iyileşme farkı, ilerleyen haftalarda gittikçe artıp belirginleşmiştir. Onuncu haftada kontrol grubunda hiçbir hayvanda %75'ten fazla kallus oluşumu veya kaynama sağlanamamışken, deney grubu hayvanların altısında (%60) kaynama ve ikisinde ise %75-%100 arası kallus oluşumu sağlanmıştır.

Yapılan deneysel çalışmalara ve verilere ve kendi çalışmamızda elde ettiğimiz radyolojik sonuçlara dayanarak, kırık iyileşmesinin erken dönemlerinde ortama verilen NO'nun iyileşmeyi ve yeni kemik oluşumunu olumlu yönde etkilediğini söyleyebiliriz. Çalışmamızın sonuçları, kurduğumuz hipotezi destekler özellikteki radyolojik verilere dayanmaktadır. Yönteme ilişkin tartışılabilir noktalarından biri, kırık iyileşmesinin radyolojik değerlendirmesinin bazen güç ve subjektif olabileceğidir. Ancak filmi çeken kişi, pozisyon, röntgen cihazı, doz, tüp mesafesi ve film banyosuna ait detayların her aşamada eşdeğer olması sağlanarak film kalitesini etkileyebilecek faktörler standardize edilmiştir. Diğer yandan, sonuçların sağlıklı olabilmesi için filmler üç ayrı uzman gözlemci tarafından değerlendirilmiş ve gözlemciler arası güvenilirlik için korelasyon katsayısı yeterli (r=0.97) bulunmuştur. İkinci nokta ise seçilen NO uygulama dozunun gerekçesidir. Doz, lokal salı-

nım olarak davranmasını planladığımız, körlemesine bir dozdur. Bildiğimiz kadarıyla, lokal uygulama ve etki için, NO veya nitrozalbumin dozuna veya yarılanma ömrüne ait, referans alınabilecek değerler veya çalışma yoktur. Albumin insan serumundaki konsantrasyona göre hazırlanmış ve hacim defekt hacmine göre belirlenmiştir.

Sonuç olarak, bu olumlu radyolojik sonuçlar hipotezimizin doğrulanması yolunda ilk aşamadır. Farklı dozlar ve NOS inhibitörlerinin kullanıldığı gruplar oluşturularak yapılacak ileri çalışmalar ve histokimyasal incelemeyle bu bulguların desteklenmesi halinde, NO uygun bir yöntemle uygulandığında ve kemik greftine eşlik ettiğinde, ortopedik rekonstrüksiyonlarda ve lokal kemik oluşumunun gerektiği klinik durumlarda, terapötik adjuvan olarak yararlı olabilir.

Kaynaklar

- Chae HJ, Park RK, Chung HT, Kang JS, Kim MS, Choi DY, et al. Nitric oxide is a regulator of bone remodelling. *J Pharm Pharmacol* 1997;49:897-902.
- Ralston SH. The Michael Mason Prize Essay 1997. Nitric oxide and bone: what a gas! *Br J Rheumatol* 1997;36:831-8.
- Fox SW, Chambers TJ, Chow JW. Nitric oxide is an early mediator of the increase in bone formation by mechanical stimulation. *Am J Physiol* 1996;270(6 Pt 1):E955-60.
- Turner CH, Takano Y, Owan I, Murrell GA. Nitric oxide inhibitor L-NAME suppresses mechanically induced bone formation in rats. *Am J Physiol* 1996;270(4 Pt 1):E634-9.
- Corbett SA, McCarthy ID, Batten J, Hukkanen M, Polak JM, Hughes SP. Nitric oxide mediated vasoreactivity during fracture repair. *Clin Orthop* 1999;(365):247-53.
- Bolander ME, Balian G. The use of demineralized bone matrix in the repair of segmental defects. Augmentation with extracted matrix proteins and a comparison with autologous grafts. *J Bone Joint Surg [Am]* 1986;68:1264-74.
- Yasko AW, Lane JM, Fellingner EJ, Rosen V, Wozney JM, Wang EA. The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats. *J Bone Joint Surg [Am]* 1992;74:659-70.
- Einhorn TA, Lane JM, Burstein AH, Kopman CR, Vigorita VJ. The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix. A radiographic and biomechanical study. *J Bone Joint Surg [Am]* 1984;66:274-9.
- Hilliquin P, Borderie D, Hervann A, Menkes CJ, Ekindjian OG. Nitric oxide as S-nitrosoproteins in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1997;40:1512-7.
- Ewing JF, Young DV, Janero DR, Garvey DS, Grinnell TA. Nitrosylated bovine serum albumin derivatives as pharmacologically active nitric oxide congeners. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;283:947-54.
- Shearer JD, Richards JR, Mills CD, Caldwell MD. Differential regulation of macrophage arginine metabolism: a proposed role in wound healing. *Am J Physiol* 1997;272(2 Pt 1):E181-90.
- Seifter E, Rettura G, Barbul A, Levenson SM. Arginine: an essential amino acid for injured rats. *Surgery* 1978;84:224-30.
- Schaffer MR, Tantry U, Efron PA, Ahrendt GM, Thornton FJ, Barbul A. Diabetes-impaired healing and reduced wound nitric oxide synthesis: a possible pathophysiologic correlation. *Surgery* 1997;121:513-9.
- Murrell GA, Szabo C, Hannafin JA, Jang D, Dolan MM, Deng XH, et al. Modulation of tendon healing by nitric oxide. *Inflamm Res* 1997;46:19-27.
- Schaffer MR, Tantry U, Ahrendt GM, Wasserkrug HL, Barbul A. Acute protein-calorie malnutrition impairs wound healing: a possible role of decreased wound nitric oxide synthesis. *J Am Coll Surg* 1997;184:37-43.
- Greenhalgh DG. The role of apoptosis in wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 1998;30:1019-30.
- Shen YH, Wang XL, Wilcken DE. Nitric oxide induces and inhibits apoptosis through different pathways. *FEBS Lett* 1998;433:125-31.
- Lopez-Farre A, Rodriguez-Feo JA, Sanchez de Miguel L, Rico L, Casado S. Role of nitric oxide in the control of apoptosis in the microvasculature. *Int J Biochem Cell Biol* 1998;30:1095-106.
- Buckwalter JA, Einhorn TA, Bolander ME, Cruess RL. Healing of the musculoskeletal tissues. In: Rockwood CA, Green DP, Bucholz RW, Heckman JD, editors. *Fractures in adults*. Vol 1, 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p. 268-76.
- Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, et al. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* 1998;101:2567-78.
- Brinker MR, Lipton HL, Cook SD, Hyman AL. Pharmacological regulation of the circulation of bone. *J Bone Joint Surg [Am]* 1990;72:964-75.
- Wallace AL, Draper ER, Strachan RK, McCarthy ID, Hughes SP. The effect of devascularisation upon early bone healing in dynamic external fixation. *J Bone Joint Surg [Br]* 1991;73:819-25.
- Corbett SA, Hukkanen M, McCarthy ID, Polak JM, Hughes SP. Expression of nitric oxide synthase isoforms in rat tibial fracture callus. *J Bone Joint Surg [Br]* 1997;79 Suppl IV:468.
- Muschler GF, Lane JM, Werntz J, Gebhardt M, Sandu H, Piergentili C, et al. Segmental femoral defect model in the rat. In: Aebi M, Regazzoni P, editors. *Bone transplantation*. 1st ed. New York: Springer; 1989. p. 167-9.