

GM-CSF'nin kırık iyileşmesi üzerine etkisinin sıçan tibiaları üzerinde araştırılması

M. Akif Kaygusuz⁽¹⁾, Nusret Ataşlı⁽²⁾, İsmet Aydoğdu⁽³⁾, Süleyman Özen⁽⁴⁾, Nurzat Elmalı⁽¹⁾, Ömer Şarlak⁽⁵⁾

Osteogenez ile hematopoez arasındaki bilinen ilişki nedeniyle özellikle miyelosupresif kanser tedavisi uygulanan hastalarda ve kemik iliği transplantasyonu sonucu oluşan nötropeni periyodunu kısaltmak amacıyla kullanılan, aplastik anemilerde, cilt ülser ve yaralarında enfeksiyon tedavisinde kullanımı araştırılan GM-CSF'nin (granülosit makrofaj stimulating factor) kırık iyileşmesi üzerine etkisi olup olmadığı araştırıldı. Üniversitemiz hayvan laboratuvarından elde edilen ortalama 240 gr ağırlığında 30 adet sıçan kullanılarak her birinde sağ arka tibialarında kırık oluşturularak intramedüller tespit yapıldı. Sıçanlar iki gruba ayrılarak 1.grup sıçana 1mikrogr/kg GM-CSF (Leucomax) 10 gün süreyle verildi kontrol grubu olan 2.gruba ise ilaç verilmedi. Operasyon sonrasında birinci gün radyolojik kontrol yapıldı, 45 gün sonra tüm hayvanlar sakrifiye edilerek radyolojik ve histolojik incelemeye alındı. Radyolojik ve histolojik değerlendirme modifiye Lane ve Sandhu kriterlerine göre yapıldı. Deney ve kontrol grubunda kemikleşme, kaynama ve remodelizasyon bulguları radyolojik olarak değerlendirildiğinde kemikleşme ve kaynamada Mann-Whitney U testine göre sonuçlar deney grubu lehine anlamlı bulundu ($p<0.05$). Remodelizasyonda bir fark görülmedi ($p>0.05$). Histolojik değerlendirmede; kaynama, spongios kemik oluşumu korteks oluşumu ve kemik iliği oluşumu olarak dört kriter yine istatistiksel olarak değerlendirildiğinde kemik iliği oluşumu dışındaki bulgular deney grubu lehine anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Anahtar kelimeler: Kırık, iyileşme, granülosit makrofaj stimulating factor

The effect of the GM-CSF on fracture healing in rats

Purpose: There are some relationship between osteogenesis and haematopoiesis. GM-CSF is a haematopoietic growth factor that is used in patients on myelosuppressive cancer therapy with neutropenia and aplastic anemia and skin ulcers. GM-CSF has stimulatory effects on especially granulocytes and macrophages lines. **Study design:** In this study the effect of GM-CSF on fracture healing in rats was investigated. Thirty rats with tibial diaphyseal fractures were divided into two groups. 1microgr/kg/day GM-CSF (Leucomax) was injected s.c to the first group for ten days while the second group had no treatment. Rats were sacrificed at the end of the sixth week and evaluated radiologically and histopathologically. Modified Lane and Sandhu criteria were used to compare the results between study and control groups. Statistical analysis was performed with Mann-Whitney U test. **Results:** Radiologic evaluation showed that bone formation and union were superior in the study group: ($p=0.0277$ and $p=0.0143$, respectively). Histopathologic scores for GM-CSF were superior to those control group: ($p=0.0384$, $p=0.0008$ and $p=0.040$ respectively). In our opinion that GM-CSF may be helpful on bone healing but more comprehensive and large studies are needed.

Keywords: Fracture, healing, granulocyt macrophage stimulating factor

1936 da yayınlanan Vaughan'ın lökoeritroblastik anemi hakkındaki makalesinden beri osteogenez ve hematopoez arasındaki ilişki bilinmektedir (18). Kemik yapımını sağlayan osteoblastlar primitif mezenkimal hücrelerden kaynağını almaktadır. Keza osteoklastların kaynağı kan hücreleridir. Emb-

riyonik hayatta hematopoetik hücreler ilk önce primitif yumurta kesesinde görülürler daha sonra fetal karaciğere ve takiben kemik iliğine ulaşırlar. Endokondral kemikleşme esnasında mezenkim hücreleri yoğunlaşarak kırık modelin daha sonra kemikleşmesinde rol alırlar. Bu kırık modelin

(1) İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Yrd. Doç. Dr.

(2) İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Uzman Dr.

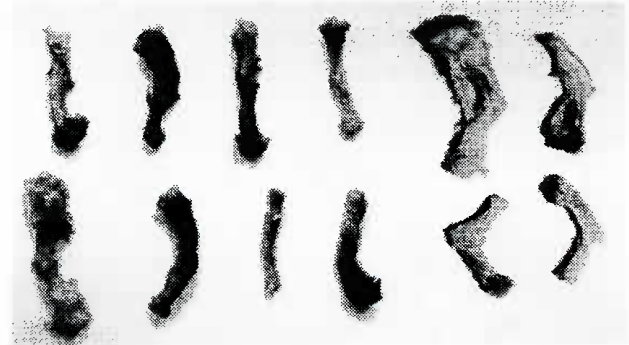
(3) İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi İç Hastalıkları Hematoloji Anabilim Dalı, Doç. Dr.

(4) İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Patoloji Öğretim Üyesi

(5) İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Prof. Dr.



Şekil 1: Deney grubu sıçan tibialarının toplu görünümüleri



Şekil 2: Kontrol grubu sıçan tibialarının toplu görünümüleri

dış tabakasına perikondrium denir. Perikondrium kapillerler tarafından geçilerek buraya hematopoetik stem hücreleri prekürsör (ana) hücreler, granülosit, eritrosit, lenfosit ve monositler ulaşmaktadır. Kemik iliğindeki mezenkimal kaynaklı stromal hücreler osteoblastik ve kartilajinöz potansiyel taşırlar ayrıca kemik iliğinde kan hücreleri ve diğer ana hücreler bulunur. Yine kandaki monositler doku makrofajları muhtemelen osteoklastlar aynı süreçte gelişirler. Osteoklastlar ve monositler kemik yıkımında diğer hematopoetik kaynaklı hücreler ile koordineli çalışmaktadır. Osteopetrozis veya Albers - Schönberg Hastalığı (mermer kemik hastalığı), carcinomatozis myelomatozis, Cooley anemisi gibi hastalıklarda bilindiği gibi hem hematopoez hem de osteogenezde bozukluk vardır. İlginç olarak mermer kemik hastalığında uygun kemik iliği transferinden sonra bütün semptomlar düzelmektedir (18). Normal erişkinlerde hematopoez kemik iliği ve dalakta olmakta ve hematopoez ve osteogenez birbirinden bağımsız iki ayrı süreç olarak gelişmektedir. Son yıllarda özellikle ilaçların neden olduğu nötropenin önlenmesinde GM-CSF rutin olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle biz çalışmamızda, koloni stimüle eden bu ilacın kırık iyileşmesi üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığını araştırdık.



Şekil 3: Deney grubunda kaynama elde edilen bazı sıçan tibiaları



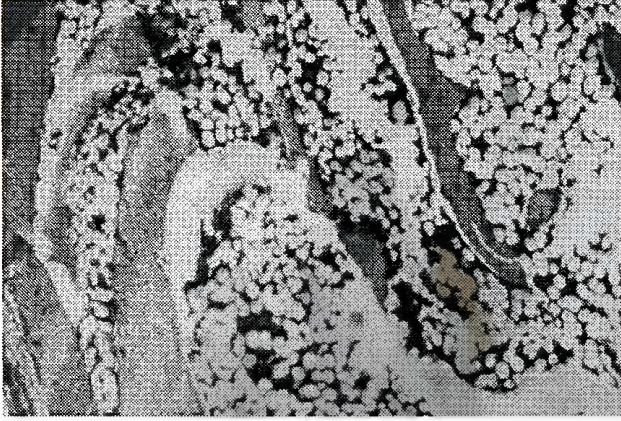
Şekil 4: Kontrol grubundan kaynama görülen sıçan tibiaları

Gereç ve yöntem

Otuz adet erkek ve dişi Sprague Dawley sıçanı kullanıldı. Sıçanlar 210-310 gram arasında ortalama 240 gr ağırlığındaydı.

Cerrahi teknik: Sıçanlara i.m ketamin anestezisi uygulandı.

Sağ arka tibiaları üzerinden girilerek mini kemik makası ile tibiaları orta kısımdan kesilerek tibialarında kırık oluşturuldu. Daha sonra enjektör iğnesi ile intramedüller fiksasyon yapıldı. Fiksasyonun yeterliliği elle bakılarak test edildi. Cilt ipekle sütüre edildi. Operasyon sonrası ayrılan onbeş sıçana 1microgr/kg Leucomax (GM-CSF) ilk günden itibaren on gün süreyle aynı saatte s.c olarak verildi. Doz miktarı kemik iliğinde optimal uyarma yapacak doz olarak tayin edildi. Kontrol grubuna ayrılan diğer onbeş sıçana hiçbir ilaç verilmedi. Bütün sıçanlar standart sıçan yemi ve su ile beslendi. Cerrahi girişimden sonra tüm hayvanların tibialarının röntgenleri çekildi. Hayvanlar kırkbeş gün sonra öldürülerek tibiaları eksize edildi. Deney ve kontrol grupları ayrılarak röntgenleri (Şekil 3, 4) ve fotoğrafları çekildi (Şekil 1, 2). Daha sonra histolojik değerlendirme amacıyla %5 formaldehit solusyonuna alındı. %5'lik nitrik asit ile dekalsifiye edilerek parafinlendi, 10-20 mikrometre kalınlığında kesilerek hematoksilen ve eosin ile boyandı (Şekil 5, 6).



Şekil 5: Deney grubundan kaynama bölgesinin histolojik görünümü



Şekil 6: Kontrol grubundan kaynama bölgesinin histolojik görünümü

Kemikleşme	Puan
Bölgede %25 Kaynama	1
%50 Kaynama	2
%75 Kaynama	3
%100 Kaynama	4
Kaynama yok	
Kaynama (proksimal ve distal)	
Kaynayabilir	1
Radyolojik kaynama	2
Kaynama yok	0
Remodelasyon	
İntramedüller remodelasyon	1
Kortikal remodelasyon	2
Remodelasyon yok	0
Her kategori için olabilecek toplam puanlar	
Kemikleşme	4
Proksimal kaynama	2
Distal kaynama	2
Remodelasyon	2
Maksimum skor	10

Tablo 1: Modifiye Lane ve Sandhu radyolojik skorlama kriterleri

Sonuçlar

Hayvanların hepsi radyolojik ve histolojik olarak modifiye Lane - Sandhu kriterlerine göre değerlendirildi (Tablo 1, 2). İstatiksel değerlendirme Mann-Whitney U testi ile yapıldı.

Buna göre; kemikleşme, kaynama ve remodelasyon ayrı ayrı incelendi. (Tablo 3, 4). Tablolarda görüldüğü gibi, kaynama ve total kemikleşme deney ve kontrol gruplarında değerlendirildiğinde; deney grubundaki sonuçlar anlamlı olarak daha iyi bulunmuştur ($p=0.0277$ ve $p=0.0143$). Re-

Kaynama (proksimal ve distal ayrı ayrı değerlendirilir)		
	Kaynama yok	0
	Fibröz kaynama	1
	Osteokondral kaynama	2
	Kemiksel kaynama	3
	Bölgenin komplet kaynaması	4
Spongios	Sellüler aktivite yok	0
	Erken apozisyonel yeni kemik	1
	Aktif apozisyonel yeni kemik	2
	Spongios kemikte reorganizasyon	3
	Komplet spongios reorganizasyon	4
Korteks	Yok	0
	Erken bulgu	1
	Korteks oluşmak üzere	2
	Reorganize olmuş	3
	Tam teşekkül etmiş	4
Kemik iliği	Kesitlerde yoksa	0
	Oluşmak üzereyken	1
	1/2'den fazla oluşmuş	2
	Komplet kırmızı ilik	3
	Matür yağ dokulu ilik	4
Her kategori için olabilecek toplam puanlar		
	Proksimal kaynama	4
	Distal kaynama	4
	Spongios	4
	Korteks	4
	Kemik iliği	4
Maksimum skor		20

Tablo 2: Modifiye Lane ve Sandhu histolojik skorlama kriterleri

modelasyonda ise anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Histolojik sonuçlarımız modifiye Lane-Sandhu kriterlerine göre değerlendirildiğinde, kaynama, spongios kemik oluşumu, korteks ve kemik iliği ayrı ayrı değerlendirildi. Sonuçlar istatistik olarak analiz edildiğinde kemik iliği oluşumu dışındaki değerler deney grubu lehine anlamlı bulunmuştur ($p=0.0384$, $p=0.0008$ ve $p=0.04$) (Tablo 5, 6). Toplam sonuçlar istatistiksel anlamda deney grubu lehine anlamlıdır ($p=0.0126$).

Kaynama	Deney Grubu	Kontrol Grubu	Sonuç
Ortalama değerler	19.10	11.90	p=0.0143
Kemikleşme			
Ortalama Değerler	18.97	12.03	p=0.0277

Tablo 3: Radyolojik kaynama ve kemikleşmenin istatistikî sonuçları

Remodelasyon	Deney Grubu	Kontrol Grubu	Sonuç
Ortalama değerler	17.77	13.23	p=0.1223

Tablo 4: Remodelasyonun istatistikî sonuçları

Deney grubunda bir sıçanda enfekte pseudoartroz görülmesine karşılık, kontrol grubunda üç sıçanda enfekte pseudoartroz görüldü.

Tartışma

Bilindiği gibi kırık iyileşmesi kan akımı ve stabiliteyle yakından ilişkilidir. Kaynamayı sağlama ve hızlandırmada kemik grefleri ve kemik bankalarının oluşturulması günceldir (16). Son yıllarda kırık iyileşmesinde yardımcı bazı ilginç yeni faktörler elde edilmiştir (8). Kırık iyileşmesinde rol oynayan bu büyüme faktörleri şunlardır: BMP (Bone morphogenetic protein).

TGF-Beta (Transforming growth factor beta), IGF (Insulin like growth factor), PDGF (Platelet derived growth factor), FGF (Fibroblast growth factor) ve TNF (Tumor necrosis factor).

Bu büyüme faktörleri inflamatuvar ve inflamatuvar olmayan hücreler tarafından salgınmaktadır.

Kırık iyileşmesinin başlangıç fazında büyüme faktörleri ve sitokinler makrofajlar tarafından salgınmaktadır. Keza osteoblastlar, kemik matriksi ve trombositler tarafından da bu maddeler üretilmektedir. Kırık veya doku yaralanması sonrası bazı aktif mediatörler ortaya çıkar.

Bu mediatörler bazı kemoatraktanlar, anjiogenetik maddeler ve büyüme faktörleridir (8).

Monosit ve makrofajlar hem hematoma içinde bulunurlar hem de yaralanmış sahaya göç ederek büyüme faktörlerinin üretiminde rol alırlar (8). Yine makrofajlar fibroplazi oluşumuna katkıda bulunurlar (8). Keza trombositler birçok büyüme faktörle-

Kaynama	Deney grubu	Kontrol Grubu	Sonuç
Ortalama değerler	18.60	12.40	p=0.0384
Spongios Kemik			
Ortalama değerler	20.27	10.37	p=0.0008
Kortikal Kemik			
Ortalama değerler	18.50	12.50	p=0.0040

Tablo 5: Histolojik değerlendirmenin kaynama, spongios ve kortikal kemik oluşumu sonuçlarının istatistikî değerleri

Kemik İliği	Deney Grubu	Kontrol Grubu	Sonuç
Ortalama değerler	17.17	13.83	p=0.2103

Tablo 6: Histolojik olarak kemik iliği oluşumunun istatistikî sonuçları

ri ihtiva ederler, bunlar PDGF (platelet derived growth factor), EGF (epidermal growth factor), TGF - Beta (transforming growth factor-beta) ve diğerleridir (8). Büyüme faktörleri polipeptitlerdir.

Son yıllarda Urist ve arkadaşlarının çok sayıda çalışma yaptığı BMP (Bone morphogenetic protein) bu büyüme faktörlerinden biri ve TGF- Beta ile aynı ailedendir (8, 15).

Riley ve Urist'e göre BMP-2 osteoblasta benzer hücrelerin oluşumunu hızlandırmaktadır (15).

Çalışmada kullandığımız GM-CSF bilindiği gibi hematopoietik bir büyüme faktörüdür.

Yapılan invitro çalışmalarda (5, 6, 7) GM-CSF'nin osteoklastlar üzerindeki etkisinden bahsedilmektedir. Buna göre GM-CSF osteoklast oluşumunda ve aktivitesinde artışa yol açmaktadır (2, 3, 5, 6, 7, 9).

Bir diğer bulgu GM-CSF etkisiyle bazı osteoklastların kemik rezorpsiyonu etkileri inhibe edilmektedir (7). Bir başka bulguya göre M-CSF aynı zamanda osteoblastik hücreler tarafından da üretilmektedir.

Yine osteoblastik ve osteoklastik aktivite kemik iyileşmesi ve remodelasyonunda birbirini tamamlayan dairesel süreçlerdir. Bilindiği gibi GM-CSF'nin antibakteriyel, antitümöral etkisi; yara iyileşmesi üzerine olumlu etkileri bulunmaktadır (9, 11). Ancak kırık iyileşmesi üzerine direkt etkisi konu-

sunda henüz yeterli invitro ve invivo çalışmalar yapılmamıştır. Bununla birlikte GM - CSF hematopoietik bir büyüme faktörüdür. Hematogenez ile osteogenez arasında ise bir ilişki olduğu (3, 7, 9, 17) öne sürülmektedir. Bunlardan yola çıkarak GM-CSF'nin kırık iyileşmesi üzerinde olumlu bir etki yapabileceği düşünülerek çalışmamız şekillendirilmiştir. GM-CSF'yi 1 mikrogram/kg/gün olarak on gün kullandık. Çünkü kemik iliği üzerindeki stimulan etkisi bu dozda on gün içinde maksimal düzeyde olmaktadır (1). Çalışılan sıçanların kemik yapılarının küçük olması ve deneyimizde kırıklarda defekt oluşturmadığımız için radyolojik değerlendirmede kırıktaki iyileşme değerlendirilmiştir.

Enfekte ve pseudoartroz olan olguları değerlendirmeye dahil ettik, zira GM - CSF'nin enfeksiyon tedavisinde kullanımı konusuna da deney grubundaki enfeksiyon azlığının katkıda bulunacağını düşündük. Histopatolojik olarak kemik iliği oluşumunda deney ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olmaması kırık tespitinin intramedüller yapılmış olmasıyla ilişkili olabilir. Remodelasyonda bir fark olmamasının deney süresinin kısa oluşuyla alakalı olduğunu düşünüyoruz. Toplu olarak sonuçlar değerlendirildiğinde GM-CSF'nin kırık iyileşmesi üzerine olumlu etkisinin olabileceğini düşünmekteyiz.

Sonuç

Çalışmamızın sonuçlarına göre şunları söyleyebiliriz

1. GM-CSF' nin kırık iyileşmesi üzerine olumlu bir etkisi olabileceğini yaptığımız çalışma desteklemektedir

2. Deney grubuna göre kontrol grubunda enfekte psödoartrozun daha fazla görülmesi enfeksiyon tedavisinde GM-CSF'nin kullanımı konusunda cesaret vericidir.

Kaynaklar

1. Barrios L, Agustini MI, Poletti OH, Juaristi J, Brandan NC: Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) on murine bone marrow and spleen erythropoiesis. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam.* 48(1):18-24, 1998.
2. Chambers TJ: The regulation of osteoclastic development and function. *Ciba Found Symp.* 136: 92-107, 1998.
3. Chihara K, Sugimoto T: The action of GH/IGF-I/IGFBP in osteoblast and osteoclasts: *Horm Res. Suppl 5:* 45-49, 1997.
4. Fixe P, Praloran V: M-CSF haematopoietic growth factor or inflammatory cytokine. *Cytokine.* 10 (1): 32-37, 1998.
5. Frost HM: The biology of fracture healing. *Clin Orthop* 248: 294-309, 1998.
6. Fuller K, Owens J, Chambers TJ. The effect of hepatocyte growth factor on the behaviour of osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 212 (2): 334-340, 1995.
7. Fuller K, Owens JM, Jager CJ, Wilson A, Moss R, Chambers TJ: Macrophage colony stimulating factor stimulates survival and chemotactic behavior in isolated osteoclasts. *J Exp Med.* 178 (5): 1733-1744, 1993.
8. Hattersley G, Dorey E, Horton MA, Chambers TJ: Human macrophage colony-stimulating factor inhibits bone resorption by osteoclasts disaggregated from rat bone. *J Cell Physiol* 137(1) 199-203, 1988
9. Hulth A: Current concepts of fracture healing. *Clin Orthop* 249: 265-284, 1989.
10. Jones TC: Future uses of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *Stem Cells (Dayt.) Suppl 1:* 229-239, 1995,
11. Jones TC: The effects of rhGM-CSF on macrophage function. *Eur J Cancer Suppl 3:*10-13, 1993.
12. Kapukaya A, Subaşı M, Kaya H, Kesemenli C, Sarı İ, Kandiyalı E: Akut osteomyelit tedavisinde granulocyte macrophage-colony stimulating factor(GM-CSF)'ün etkisi. *Acta Orthop Traumatol Turc* 32: 325-328, 1998.
13. Kelsey S: The effects of GM-CSF on host defence against fungal infection. *Report from a meeting held on 'New perspectives on GM-CSF'* July 17-19, 1992. Kinsale, Ireland.
14. Lane JM, Sandhu HS: Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am.*18(2): 213-225, 1987.
15. Martin TJ, Ng KW: Mechanisms by which cells of osteoblasts lineage control osteoclast formation and activity. *J Cell Biochem.* 56 (3): 357-366, 1994.
16. Riley EH, Lane JM, Urist MR, Lyons KM, Lieberman JR: Bone morphogenetic protein-2 *Clin Orthop* 324: 39-46, 1996.
17. Şener N, Özger H: Kemik greftleri ve kemik bankaları. *Acta Orthop Traumatolog Turc* 29: 335-338, 1995.
18. Vaughan J: Osteogenesis and haematopoiesis. *The Lancet.* 18: 133-136, 1981.

19. Yao GQ, Sun BH, Hammond EE, Spencer EN, Horowitz MC, Insoyna KL, Weir EC: The cell surface form of colony stimulating factor 1 is regulated by osteotropic agents and supports formation of multinucleated osteoclasts-like cells. *J Biol Chem.* 273 (7): 4119-4128, 1998.
20. Zhang ZY, Muhlbauer R, Felix R: Phorbol myristate acetate downregulates the binding sites for colony-stimulating factor 1 on osteoclasts isolated from rats. *Calcif Tissue Int.* 62 (2): 148-152, 1998.

Yazışma adresi:

*Yrd. Doç. Dr. M. Akif Kaygusuz
İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi
Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı
44000, Kampüs, Malatya, Türkiye*