



Dolaşımdaki endotelial progenitör hücreler, serum vasküler endotelial büyüme faktörü ve hipogamaglobulineminin Perthes hastalığına etkileri

Hicabi SEZGİN¹, Birol GÜLMAN², Alper ÇIRAKLI³, Abdülkerim BEDİR⁴,
Dilek USTA⁵, Sina COŞKUN², Alişan YILDIRAN⁵

¹Abi Evran Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği, Kırşehir;

²Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Samsun;

³Amasya Üniversitesi Sabuncuoğlu Şerefeddin Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği, Amasya;

⁴Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Samsun;

⁵Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Samsun

Amaç: Bu çalışmada Legg-Calvé-Perthes hastalığının (PH) etiyopatogenezinin aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak Perthes hastaları ile kontrol grubu olgularında dolaşımdaki endotelial progenitör hücre (EPH) sayısı, serum vasküler endotelial büyüme faktörü-A (VEBF-A) ve immüno globulin düzeyleri karşılaştırıldı.

Çalışma planı: Çalışmaya 28 PH olgusu (ortalama yaş: 8±3.8) ve yaşları eşleşen 25 sağlıklı kontrol olgusu dahil edildi. Periferik venöz kan örneklerinde EPH, serum VEBF-A ve immüno globulin düzeyleri ölçüldü. Karşılaştırma ve korelasyon analizleri uygulandı.

Bulgular: PH grubundaki olguların 17'si fragmantasyon, 11'i ise iyileşme döneminde idi. Hastalık 4 olguda bilateral iken, 14 hastada hipogamaglobulinemi mevcuttu. PH grubundaki medyan EPH sayısı 80 olup kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti (p=0.011). Serum VEBF-A düzeylerinde anlamlı farklılık saptanmadı (p=0.354). PH grubunda EPH sayısı serum IgG düzeyi ile tersine korele idi (r=-0.403, p=0.03). Mutlak EPH sayısı fragmantasyon dönemindeki hastalarda, iyileşme dönemindekilerden; bilateral hastalığı olanlarda ise unilateral olanlardan anlamlı olarak yüksekti. Dolaşımdaki EPH sayısı Perthes hastalığının fragmantasyon safhasında (r=0.605, p=0.01) ve hipogamaglobulinemi varlığında (r=0.599, p=0.001) serum VEBF-A düzeyi ile korelasyon göstermekteydi.

Çıkarımlar: Fragmantasyon evresindeki hastalarda görülen yüksek EPH sayısı ve bilateral tutulumu olan hastalarda nispeten daha yüksek bulunan EPH sayısı, PH'nin takibinde değerli bir gösterge olabilir. Hastalığın fragmantasyon evresinde ve hipogamaglobulinemi varlığında EPH sayısı ve serum VEBF-A düzeyi arasındaki güçlü korelasyonu açıklamak için daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır.

Anahtar sözcükler: Dolaşımdaki endotelial progenitör hücre; hipogamaglobulinemi; Perthes hastalığı; serum vasküler endotelial büyüme faktörü.

Yazışma adresi: Dr. Hicabi Sezgin, Ahi Evran Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği, 40000 Kırşehir.

Tel: +90 537 – 062 44 94 e-posta: hicabi.sezgin@hotmail.com

Başvuru tarihi: 06.10.2013 **Kabul tarihi:** 30.12.2013

©2014 Türk Ortopedi ve Travmatoloji Derneği

Bu yazının çevrimiçi İngilizce versiyonu

www.aott.org.tr adresinde

doi: 10.3944/AOTT.2014.13.0084

Karekod (Quick Response Code)



Femur başı osteonekrozu, pediatrik popülasyonda kalça eklemi etkileyen en ciddi rahatsızlıklardan biridir. Legg-Calvé-Perthes hastalığı (PH), osteonekrozun yaygın bir pediatrik formu olup, 2 ile 12 yaş arasındaki çocukları etkiler ve kümülatif insidansı 740 erkekte 1 ve 3700 kızda 1 şeklindedir.^[1]

Histolojik çalışmalar, normalde endokondral ossifikasyonun görüldüğü epifiz kırıkdağının derin tabakasında iskemik hasar olduğunu göstermektedir.^[2] Bu hasarın geri döndürülebilme yeteneği, immatür femur başının normal büyüme ve gelişmesinin sürdürülmesi açısından önemlidir. İskemik nekroz sonrası, endokondral ossifikasyonun restorasyonu ve femur başı büyümesinin yeniden başlamasından sorumlu biyolojik faktörler henüz araştırılmamıştır.^[3] Hastalığın etiolojisi ile ilgili olarak; çevresel faktörler, pıhtılaşma bozuklukları (protein C eksikliği, trombofil), travma, damarsal anomaliler, hiperaktivite gibi çok farklı faktörler araştırılmışsa da belirgin bir ilişki bulunamamıştır.^[4-9] Bununla birlikte, literatürde yetişkinde femur başı idiopatik avasküler nekrozu ile endotelial progenitör hücre (EPH) arasında bir ilişki olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur.^[10]

Endotelial progenitör hücreler, primitif hematopoetik kök hücrelerden köken alan ve endotelial hücrelere dönüşme kabiliyeti taşıyan hücrelerdir. EPH'lerin dolaşıma katılmalarını arttıran birçok patolojik ve fizyolojik olay mevcuttur. Bölgesel iskeminin, EPH mobilizasyonunda güçlü bir endojen uyarıcı olduğu yapılan araştırmalarda gösterilmiştir. Vasküler endotelial büyüme faktörü-A (VEBF-A) ve granülosit makrofaj-koloni uyarıcı faktör (*granulocyte macrophage-colony stimulating factor*, GM-CSF) gibi hasarlı dokudan salınan mediatörler kemik iliğinin sessiz bölgesinde yer alan EPH öncüllerini uyarak onların EPH'lere dönüşümünü hızlandırır.^[11]

Hipogamaglobulinemi, bir ya da daha fazla sayıdaki serum immünoglobulin izotipinin, yaşa uygun ortalama değerlere göre 2 standart sapmanın altına düşmesi olarak tanımlanır. Fizyolojik hipogamaglobulinemi doğumdan itibaren 6 aydan daha uzun süre devam ettiği takdirde, bu durum, süt çocukluğu döneminin geçici hipogamaglobulinemisi olarak adlandırılır. İmmünoglobulin düzeylerinin normale dönme süresine ait üst limitin 3 yıl olarak tanımlanmış olmasına rağmen, bazı çalışmalarda bu sürenin daha ileri yaşlara kadar gecikebileceği bildirilmiştir. Son yıllarda bu hastalar, tanımlanmamış/sınıflandırılmamış hipogamaglobulinemi olarak kategorize edilmiştir.^[12] Yakın zamanda yapılan bir çalışmanın sonuçları, intravenöz immünoglobulin tedavisi sonrası tümör nekroz faktör alfa (TNF-alfa) ve C-reaktif protein (CRP) ile ilişkili olarak dolaşımdaki EPH fonksiyonlarının iyileştiğini göstermektedir.^[13]

Bu çalışmada, PH'nin etiopatogenezinde rol oynaması muhtemel dolaşımdaki EPH sayısı, serum VEBF-A düzeyi ve hipogamaglobulinemi, koagülasyon anormallikleri ve kompleman anormallikleri gibi klinik anlamda ilişkili olabilecek enflamatuvar süreçler incelendi.

Hastalar ve yöntem

Bu çalışma için Yerel Etik Kurulu'ndan onay alındıktan sonra, tüm katılımcıların aydınlatılmış onamları alındı. Haziran 2011 ile Aralık 2012 tarihleri arasında, PH bulunan 28 hasta (ortalama yaş: 8±3, medyan yaş: 8, dağılım: 2-12 yaş) ve yaşları eşleşen rastgele seçilen 25 sağlıklı çocuk (SÇ) (ortalama yaş: 7.6±3.2, medyan yaş: 8, dağılım: 2-12 yaş) çalışmaya dahil edildi. PH tanısı radyografik incelemelerle konuldu. Bilinen veya semptomatik bir kardiyovasküler hastalık, herhangi bir akut ya da kronik enfeksiyon veya habaset, ilaç kullanımı olan çocuklar ile direkt kalça travması öyküsü kanıtlanabilir olan veya olası bağlantılı nedenlere sahip olan hastalar çalışma dışında bırakıldı. Bütün hastalar, bir pediatrik immünolog tarafından fizik muayene, laboratuvar testleri, klinik teşhis ve hastalık ve tedavi öyküsü ile ilgili bir anket ile değerlendirildi. Hastalar, başvuru anındaki radyografik bulguları ile Waldenström evrelemesine göre sınıflandırıldı (fragmentasyon ve iyileşme evresi). Femur başının parçalanmış veya erimiş görüldüğü durumlar fragmentasyon evresi olarak, femur başının yeniden yapılanması ise iyileşme evresi olarak tanımlandı. Katılımcıların demografik verileri Tablo 1'de verilmiştir.

Tam kan sayımı için 0.5 cc, akım sitometri ile EPH değerlendirilmesi için 2 cc, immünoglobulin, CRP, CH50 ve VEBF-A düzeyleri için 4 cc, protrombin zamanı (PT) ve aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT) seviyeleri için 1.5 cc olmak üzere PH grubundaki katılımcılardan toplam 8 cc periferik venöz kan örneği alındı. Biyokimya tüpü içindeki kan örneğinden serum ayrıldı ve 3 adet Eppendorf Tubes® içine konuldu. Bunlardan biri serum immünoglobulin ve CRP düzeylerini belirlemek için üniversitenin merkez laboratuvarına gönderildi, diğer iki tüp ise serum VEBF-A ve CH50 düzeyleri için inceleme gününe kadar Çocuk İmmünolo-

Tablo 1. Çalışmadaki çocukların demografik verileri.

	PH (n=28)	SÇ (n=25)
	Ortalama±SS	Ortalama±SS
Yaş (yıl)	8±3	7.6±3.2
Cinsiyet (E/K)	23/5	19/6
Ağırlık (kg)	30±15	32.2±13.2
Boy (cm)	123±23	128±22

PH: Perthes hastası, SÇ: Sağlıklı çocuklar, SS: Standart sapma.

ji-Alerji Bilim Dalı'nda -80°C'de muhafaza edildi. PT ve aPTT örnekleri de aynı gün üniversitenin merkez laboratuvarında analiz edildi.

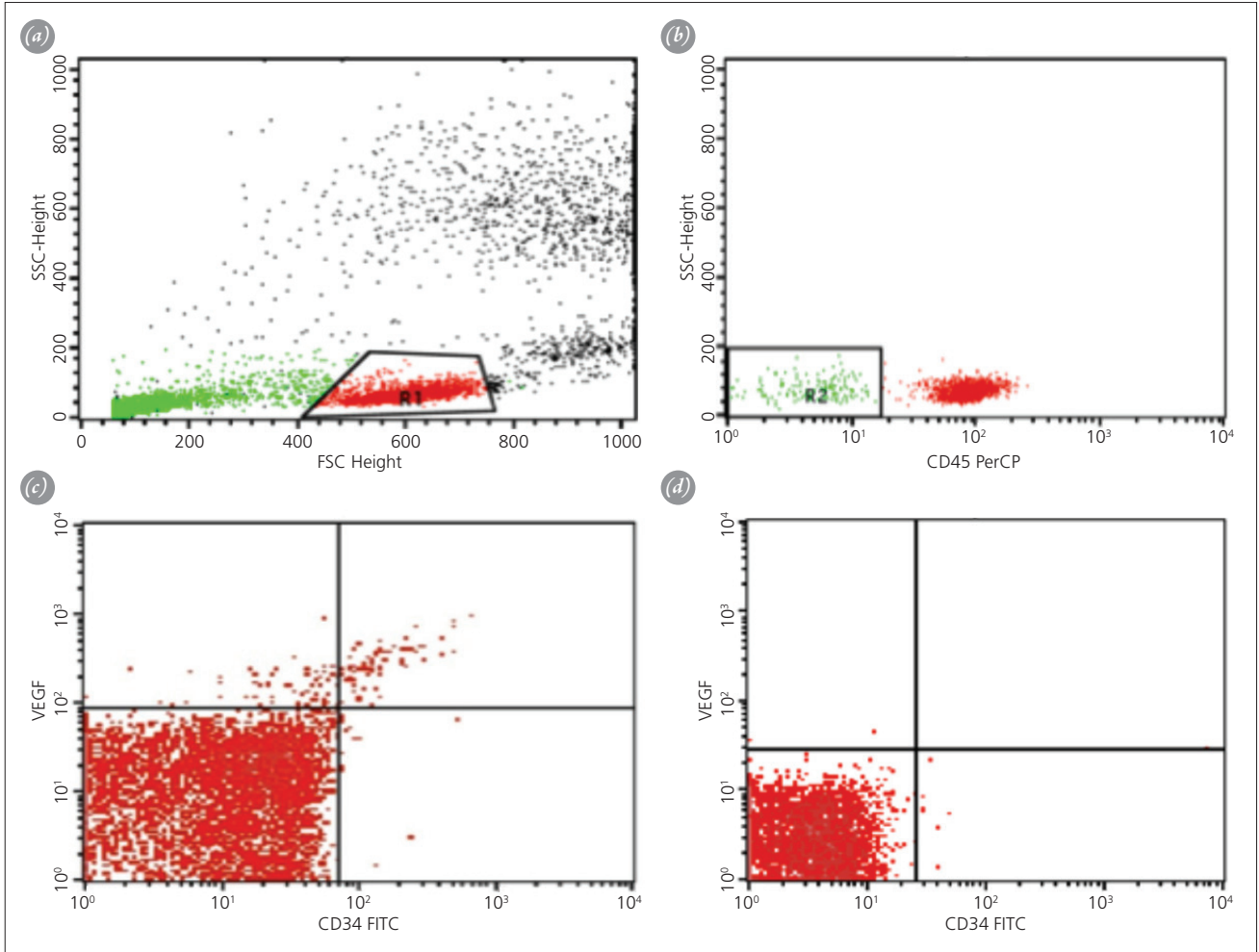
Perthes hastalarının bulunduğu grupta CH50 düzeylerinin incelenmesi planlanmış olmasına rağmen, ticari CH50 kiti uygulanamadığı için çalışmanın kompleman sisteme ilişkin bölümü çıkarılmak zorunda kaldı.

Kontrol grubundan (SÇ), tam kan sayımı için 0.5 cc, akım sitometri ile EPH değerlendirilmesi için 2 cc ve serum VEBF-A düzeyi için 2 cc olmak üzere toplam 4.5 cc kan alındı. Bu gruptaki çocuklar sağlıklı olduğu için, PH grubu ile karşılaştırmak için kendi yaşlarına ait immünoglobulin, CRP, PT ve aPTT referans değerleri kullanıldı.

Hipogamaglobulinemi, bir veya daha fazla immü-

noglobulin izotipinde (IgG, IgA ve IgM) yaşa göre 2 standart sapmanın altında azalma olarak tanımlandı.^[12]

Her olgudan toplam 5 cc periferik venöz kan örneği toplanarak EDTA tüplerine konuldu. Bunun 3 cc'si, dolaşımdaki EPH'lerin sayımı için, kalan 2 cc ise eşzamanlı olarak mutlak lenfosit sayısının saptanması için kullanıldı. Mononükleer hücreler (MNH) Ficoll-Paque yoğunluk gradyan santrifüj sistemi kullanılarak standart protokollere göre ayrıldı. Mononükleer hücreler iki kez yıkanmış ve 0.2 ml'lik fosfat tampon solüsyonu içinde yeniden süspansiyon haline getirildi ve daha sonra ışıktan uzak, oda sıcaklığında 20 dakika boyunca konjuge antikor CD45-peridinin-klorofil-protein kompleksi (PerCP) (BD Pharmingen™; BD Biosciences, San Jose, CA, ABD), CD34-floresin izotiyosiyanat (FITC) (BD Biosciences, San Jose, CA, ABD) ve VEGFR2-



Sekil 1. MNH'ler yoğunluk gradyan ortamında santrifüj ile periferik kandan ayrıldı. Sitometre, 100,000 olay elde etmeye ayarlandı ve lenfosit işaretleme alanındaki hücreler belirlendi. CD45^{low} işaretleme alanı içinde, EPH'ler CD34+ ve VEBFR2+'nin ikili ekspresyonu ile belirlendi. Lenfosit sayımı baz alınarak, dolaşımdaki mutlak EPH sayısı/ml hesaplandı. (a) R1 lenfosit işaretleme alanını göstermektedir. (b) Lenfosit işaretleme alanı içindeki R2 CD45^{low} işaretleme alanıdır. (c) CD34+/VEBFR2+ (EPH) hücrelerinin mutlak sayısı, mutlak lenfosit sayısı ile oranlanmıştır. (d) Kontrol grubundaki CD34+/VEBFR2+ hücre sayısı. EPH: Endotelial progenitor hücreler; MNH: Mononükleer hücre; VEBF: Vasküler endotelial büyüme faktörü. [Bu şekil, derginin www.aott.org.tr adresindeki çevrimiçi versiyonunda renkli görülebilir.]

fikoeritrin (PE) (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, ABD) bulunan 10 µl'lik bir panel ile inkübe edildi. Örnekler daha sonra FACS çözücü solüsyonu içerisinde 15 dakika boyunca inkübe edildi. IgG1-FITC ya da PE izotip kontrolleri ile boyanmış hücreler negatif kontroller olarak alındı. Lenfositler uygun kapılandıktan sonra, CD45^{low}/CD34+/VEBFR2+ hücreler (EPH), CD45^{low} işaretleme alanında (*gate*) CD34+ ve VEBFR2+'nin ikili ekspresyonu aracılığıyla belirlendi (Şekil 1).^[10] Sitometre cihazı 100,000 olaya ayarlandı. Toplanan veriler CellQuest™ (BD Biosciences, San Jose, CA, ABD) yazılımı kullanılarak işlendi. Bu analizler bütün olgularda yapılmış olup, çalışma boyunca hastaların klinik durumundan haberdar olmayan iyi eğitilmiş bir operatör tarafından gerçekleştirildi. Dolaşımdaki mutlak EPH sayısı, mutlak lenfosit sayısı bazında, kan örneğinde 1 ml başına hücre sayısı olarak orantılandı.

Serum VEBF-A, piyasada mevcut enzim-bağlı immünosorbent tahlil kitleri (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, ABD) ile üreticinin talimatlarına uygun olarak ölçüldü. Her ölçüm 5 kez yapıldı. VEBF-A düzeyi, analiz edilen her bir örnek grubu için oluşturulan standart eğriden yola çıkılarak saptandı.

Sonuçlar ortalama±standart sapma veya medyan değerleri olarak ifade edildi. Her iki gruptan elde edilen veriler normal dağılım göstermediğinden, tüm verileri değerlendirmek için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Parametreler arasında ilişki olup olmadığı korelasyon

analizi ile belirlendi. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak belirlendi.

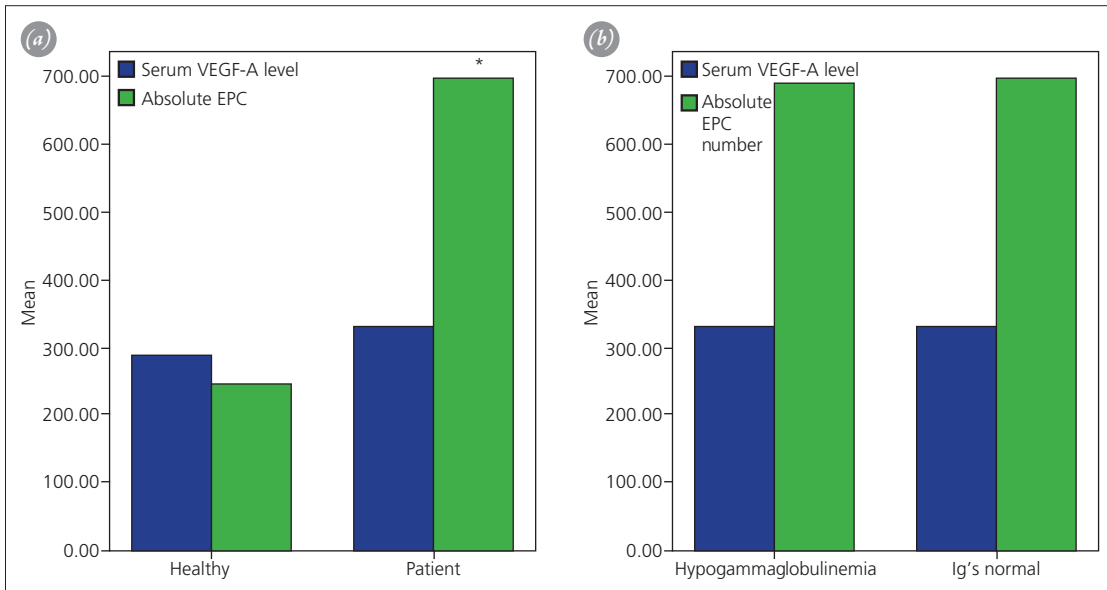
Bulgular

Perthes hastalığı bulunan gruptaki hastaların 17'sinin fragmentasyon evresinde, kalan 11'inin ise iyileşme evresinde olduğu belirlendi.

Her iki grubun toplam lenfosit sayısı ve serum VEBF-A düzeyleri benzer olmasına rağmen, mutlak EPH sayısı PH grubunda anlamlı olarak daha yüksek idi (Şekil 2a, Tablo 2). Hemogloblin düzeylerinin de PH grubunda yüksek ($p=0.028$) ve serum VEBF-A düzeyleri ile ilişkili olduğu saptandı ($p=0.013$, $r=0.463$). PH grubunda, serum IgG düzeyi INR düzeyi ile doğru orantılı ($p=0.012$, $r=0.466$), mutlak EPH sayısı ile ters orantılı olarak bulundu ($p=0.033$, $r=-0.403$).

Bilateral tutulum saptanan Perthes hastaları ($n=4$) ile unilateral tutulumlu hastalarla ($n=24$) karşılaştırıldığında, mutlak EPH sayısı ve serum VEBF-A düzeylerinin bilateral tutulumlu olanlardan anlamlı olarak daha yüksek olduğu belirlendi (Tablo 3). Benzer şekilde, fragmentasyon evresindeki Perthes hastalarında, mutlak EPH sayısı iyileşme evresindeki hastalardan daha yüksek iken, serum VEBF-A düzeylerinde anlamlı bir farklılık görülmedi (Tablo 4).

Perthes hastalığı olan 14 çocukta hipogamaglobulinemi saptandı. Hipogamaglobulinemisi olan Perthes



Şekil 2. Dolaşımdaki EPH sayısı. (a) 28 Perthes hastası ve 25 yaşı eşleşen sağlıklı çocuktan alınan periferik kan örneklerinde CD45^{low}/CD34+/VEBFR+ hücreler saptanmıştır. Dolaşımdaki EPH sayısı PH grubunda daha yüksektir. (b) Hipogamaglobulinemi varlığında dolaşımdaki EPH sayısı. Veriler medyan değerler olarak ifade edilmiş ve birbirine karşılaştırılmıştır. EPH: Endotelial progenitör hücreler; PH: Perthes hastalığı; VEBF: Vasküler endotelial büyüme faktörü. * $p < 0.05$. [Bu şekil, derginin www.aott.org.tr adresindeki çevrimiçi versiyonunda renkli görülebilir.]

Tablo 2. Perthes hastası ve sağlıklı çocukların total lenfosit sayısı, mutlak endotelial progenitör hücreler sayısı ve serum vasküler endotelial büyüme faktörü-A düzeylerinin karşılaştırılması.

	Perthes hastası (n=28)	Sağlıklı çocuklar (n=25)	p
Total lenfosit sayısı (/mm ³)			
Ortalama±SS	2989±1305	2901±664	0.232
Medyan	2625	2870	
Min-Maks	1700-6830	1390-5000	
Mutlak endotelial progenitör hücreler (/mm ³)			
Medyan	80	0.011	35
Min-Maks	1-1289	0-120	
Vasküler endotelial büyüme faktörü-A (pg/ml)			
Ortalama±SS	323±170	278±125	0.354
Medyan	304	272	
Min-Maks	83-854	67-553	

Tablo 3. Unilateral ve bilateral Perthes hastalığı bulunan olgulardaki total lenfosit sayısı, mutlak endotelial progenitör hücreler sayısı ve serum Vasküler endotelial büyüme faktörü-A düzeylerinin karşılaştırılması.

	Bilateral Perthes hastası (n=4)	Unilateral Perthes hastası (n=24)	p
Total lenfosit sayısı (/mm ³)			
Ortalama±SS	2710±808	3035±1378	0.924
Medyan	2416	2660	
Min-Maks	2110±3900	1700±6830	
Mutlak endotelial progenitör hücreler (/mm ³)			
Medyan	944	49	0.005
Min-Maks	295-1242	0-1289	
Vasküler endotelial büyüme faktörü-A (pg/ml)			
Ortalama±SS	447±122	302±170	0.07
Medyan	450	258	
Min-Maks	325-564	83-854	

Tablo 4. Fragmentasyon ve iyileşme evresindeki Perthes hastalarında, total lenfosit sayısı, mutlak endotelial progenitör hücreler sayısı ve serum Vasküler endotelial büyüme faktörü-A düzeylerinin karşılaştırılması.

	Fragmentasyon evresi (n=17)	İyileşme evresi (n=11)	p
Total lenfosit sayısı (/mm ³)			
Ortalama±SS	3327±1545	2465±533	0.134
Medyan	2910	2500	
Min-Maks	2000±6810	1700±3680	
Mutlak endotelial progenitör hücreler (/mm ³)			
Medyan	141	36	0.033
Min-Maks	10-1289	1-815	
Vasküler endotelial büyüme faktörü-A (pg/ml)			
Ortalama±SS	357±196	271±109	0.264
Medyan	375	225	
Min-Maks	83-854	96-454	

hastalarının EPH sayısı ve serum VEBF-A düzeylerinin, hipogamaglobulinemi olmayan Perthes hastalarınıninkinden farklı olmadığı kaydedildi (Şekil 2b, Tablo 5). CRP

düzeyleri hipogamaglobulinemili Perthes hastalarında daha yüksek olarak bulundu (p=0.024). Hipogamaglobulinemisi olan Perthes hastalarında, serum IgG dü-

Tablo 5. Hipogamaglobulinemisi olan ve olmayan Perthes hastalarının total lenfosit sayısı, mutlak endotelial progenitör hücreler sayısı ve serum Vasküler endotelial büyüme faktörü-A düzeylerinin karşılaştırılması.

	Hipo Ig Perthes hastalığı (n=14)	Normal Ig Perthes hastalığı (n=14)	p
Total lenfosit sayısı (/mm ³)			
Ortalama±SS	3266±1616	2711±871	0.329
Medyan	2730	2545	
Min-Maks	1900-6830	1700±4740	
Mutlak endotelial progenitör hücreler (/mm ³)			
Medyan	80	89	0.839
Min-Maks	1-1242	10-1289	
Vasküler endotelial büyüme faktörü-A (pg/ml)			
Ortalama±SS	326±188	320±157	0.701
Medyan	275	364	
Min-Maks	119-854	83-541	

zeylerinin INR düzeyleri ile doğru ($p=0.015$, $r=0.455$), mutlak EPH düzeyleri ile ters orantılı ($p=0.042$, $r=-0.387$) olduğu görüldü.

Dolaşımdaki EPH sayısı Perthes hastalığının fragmantasyon safhasında ($r=0.605$, $p=0.01$) ve hipogamaglobulinemi varlığında ($r=0.599$, $p=0.001$) serum VEBF-A düzeyi ile korelasyon göstermekteydi.

Tartışma

Endotelial progenitör hücreler vasküler hasarın onarılması ve yeni kan damarı oluşumunu içeren vasküler hemostaz sürecine olumlu katkıda bulunabilir.^[10] Bu çalışma ile, dolaşımdaki EPH sayısı, serum VEBF seviyesi ile hipogamaglobulinemi, koagülasyon bozuklukları ve kompleman sistemindeki bozukluklar gibi önemli inflamasyon yollarını incelenerek PH'nin etiopatogenezinin açıklanması amaçlandı. Ne yazık ki, ticari kitlere bağlı olarak kompleman sisteminin değerlendirilmesi mümkün olmadı. Bu çalışmanın bulguları, mutlak EPH sayısının tüm PH gruplarında belirgin olarak daha yüksek olduğunu gösterdiyse de, serum VEBF-A düzeylerine dair elde edilen verilerle yeterli bilgi sağlanamadı. Hipogamaglobulinemisi olan Perthes hastalarında, serum IgG düzeyleri ile mutlak EPH sayısı ters orantılı idi. Ayrıca, fragmantasyon evresindeki Perthes hastalarında ve hipogamaglobulinemisi olan hastalarda EPH sayısı ile serum VEBF-A düzeyleri korele idi. Bu araştırma, Perthes hastalığı olan çocuklarda serum VEBF-A seviyeleri ile EPH sayısını değerlendiren ilk çalışmadır.

Feng ve ark.^[10] tarafından femur başı non-travmatik avasküler nekrozlu hastalarda (n=54) bir çalışma yapılmış ve bu hastalar ile sağlıklı kontrol grubunun EPH sayısı ve fonksiyonları karşılaştırılmıştır. Çalışma örneklemini, yaş ortalaması yaklaşık 45 yıl olan steroide bağlı,

alkole bağlı ve idiopatik olgulardan oluşmuştur. Yazarlar, EPH sayısı ve fonksiyonlarının (yani migratuvar kapasitelerinin), femur başı non-travmatik avasküler nekrozu olan hastalarda azaldığını göstermiştir. Bu durum, hastalığın risk faktörlerinin anjiyogenez ve vasküler onarım sürecinde EPH'lerin biyolojisini değiştirebileceğini göstermektedir. Bu bulgular ve EPH sayıları çalışmamızın bulgularına göre çok farklılık göstermektedir. Aradaki bu fark, diğer çalışmadaki hasta grubunun çok daha yaşlı olması ve özellikle steroide bağlı hastalardaki gibi etiyolojik nedenlerle açıklanabilir.

Fizyolojik hipogamaglobulinemi doğumdan itibaren 6 aydan daha uzun süre devam ettiği takdirde bu durum, süt çocukluğu döneminin geçici hipogamaglobulinemisi olarak adlandırılır. İmmünoglobulin düzeylerinin normale dönmesi için üst limit 3 yıl olarak tanımlanmış olsa da, bu süre daha da uzarsa, hastalar tanımlanmamış/sınıflandırılmamış hipogamaglobulinemi olarak kategorize edilir. Enfeksiyonlara ek olarak, bu primer immün yetmezlikler; otoimmün hastalıklar, düzensiz inflamasyon ve habasete yatkınlık dahil olmak üzere çok geniş bir klinik spektruma sahiptir.^[12,14] Perthes hastalığının kapsadığı yaş grubu ve yüksek çocukluk hipogamaglobulinemisi prevalansı sebebiyle, çalışmamızda, bu faktörler arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçladık. Nitekim serum IgG düzeyleri, mutlak EPH düzeyi ile ters orantılı olarak bulunmuştur. Ayrıca, Perthes hastalığının fragmantasyon evresinde ve hipogamaglobulinemisi olan Perthes hastalarında EPH ve serum VEBF-A düzeyleri arasında korelasyon olduğu saptanmıştır.

Xu ve ark., Kawasaki hastalığı olan hastalarda intravenöz immünoglobulin (IVIG) ve aspirin tedavisinin EPH fonksiyonları üzerindeki etkilerini araştırmış, IVIG ve aspirin ile tedaviden sonra dolaşımdaki EPH

fonksiyonlarında düzelme olduğunu ve bunun TNF-alfa ve CRP konsantrasyonlarındaki azalma ile ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir.^[13] Literatürdeki bu bulgular, çalışmamızdaki hipogamaglobulinemisi olan hasta grubuna ait bulgularımızı desteklemektedir.

Sonuç olarak, Perthes hastalığının tanısında en önemli araç radyolojik muayene olmakla birlikte, fragmentasyon evresindeki hastalarda görülen yüksek EPH sayısı ve çift taraflı tutulumu olan hastalarda tek taraflı tutulum gösterenlere göre nispeten daha yüksek bulunan EPH sayısı, Perthes hastalarının takibinde değerli bir gösterge olabilir. Hastalığın fragmentasyon evresinde ve hipogamaglobulinemi varlığında EPH sayısı ve serum VEBF-A düzeyi arasındaki güçlü korelasyonu açıklamak için daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır.

Teşekkür: İstatistiksel analizler konusunda sağlanmış olduğu değerli rehberlik desteği için Sayın Prof. Dr. Yüksel BEK'e teşekkürlerimizi sunarız.

Mali destek: Bu proje, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No: 1904.10.033).

Çıkar örtüşmesi: Çıkar örtüşmesi bulunmadığı belirtilmiştir.

Kaynaklar

- Molloy MK, MacMahon B. Incidence of Legg-Perthes disease (osteochondritis deformans). *N Engl J Med* 1966;275:988-90.
- Kim HK, Su PH, Qiu YS. Histopathologic changes in growth-plate cartilage following ischemic necrosis of the capital femoral epiphysis. An experimental investigation in immature pigs. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83-A:688-97.
- Kim HK, Bian H, Randall T, Garces A, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Increased VEGF expression in the epiphyseal cartilage after ischemic necrosis of the capital femoral epiphysis. *J Bone Miner Res* 2004;19:2041-8.
- Almeida Matos M. The role of protein C deficiency in the etiology of Perthes disease. *Ortop Traumatol Rehabil* 2008;10:274-8.
- Daniel AB, Shah H, Kamath A, Guddettu V, Joseph B. Environmental tobacco and wood smoke increase the risk of Legg-Calvé-Perthes disease. *Clin Orthop Relat Res* 2012;470:2369-75.
- Hailer YD, Montgomery S, Ekblom A, Nilsson O, Bahmanyar S. Legg-Calvé-Perthes disease and the risk of injuries requiring hospitalization: a register study involving 2579 patients. *Acta Orthop* 2012;83:572-6.
- Loder RT, Schwartz EM, Hensinger RN. Behavioral characteristics of children with Legg-Calvé-Perthes disease. *J Pediatr Orthop* 1993;13:598-601.
- Perry DC, Green DJ, Bruce CE, Pope D, Dangerfield P, Platt MJ, et al. Abnormalities of vascular structure and function in children with Perthes disease. *Pediatrics* 2012;130:126-31.
- Yılmaz D, Karapınar L, Karapınar B, Oztürk H, Kavaklı K. Evaluation of anticoagulant system in Turkish children with Perthes disease. *Pediatr Int* 2005;47:43-8.
- Feng Y, Yang SH, Xiao BJ, Xu WH, Ye SN, Xia T, et al. Decreased in the number and function of circulation endothelial progenitor cells in patients with avascular necrosis of the femoral head. *Bone* 2010;46:32-40.
- Tepper OM, Sealove BA, Murayama T, Asahara T. Newly emerging concepts in blood vessel growth: recent discovery of endothelial progenitor cells and their function in tissue regeneration. *J Investig Med* 2003;51:353-9.
- Keles S, Artac H, Kara R, Gokturk B, Ozen A, Reisli I. Transient hypogammaglobulinemia and unclassified hypogammaglobulinemia: 'similarities and differences'. *Pediatr Allergy Immunol* 2010;21:843-51.
- Xu MG, Men LN, Zu Y, Zhao CY, Meng XC, Wang T. The functions of endothelial progenitor cells were significantly improved after treatment with intravenous immunoglobulin and aspirin in children with Kawasaki disease. *Pediatr Cardiol* 2011;32:455-60.
- Al-Muhsen SZ. Gastrointestinal and hepatic manifestations of primary immune deficiency diseases. *Saudi J Gastroenterol* 2010;16:66-74.