



Distraksiyon osteogenezinde HİF stabilizasyonunun etkisi

Ahmet ÖZDEL¹, Bartu SARISÖZEN¹, Ulviye YALÇINKAYA², Burak DEMİRAĞ¹

¹Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Bursa;

²Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Bursa

Amaç: Çalışmamızda sıçandaki distraksiyon osteogenezi (DO) modelinde oral olarak uygulanabilen hipoksi ile indüklenebilir faktörün (HİF) etkisinin incelemeyi amaçladık.

Çalışma planı: Çalışmada sol tibia diyafizine osteotomi uygulanan 24 Wistar albino sıçan kullanıldı. Denekler deney ve kontrol olmak üzere iki gruba ayrıldı. Eksternal fiksator ile tespit sağlanarak, deney grubuna HİF stabilizatörü verildi. Cerrahi sonrası 5. günlük latent dönemi takiben, 10 gün boyunca hızlandırılmış distraksiyon (günde iki kez 0.4 mm) uygulandı. Histolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmeler yapıldı.

Bulgular: Deney grubundaki vasküler endotelial büyüme faktörü (VEBF) düzeyi kontrol grubuna kıyasla daha yüksek idi ($p < 0.05$). Deney grubundaki intramembranöz ossifikasyon oranınının 16. ve 30. günlerde kontrol grubuna göre bir miktar daha yüksek olduğu gözlemlendi. Yine deney grubundaki endokondral ossifikasyon miktarınının 16. günde daha yüksek olduğu bulundu.

Çıkarımlar: Hipoksi ile indüklenebilir faktör stabilizatörünün oral olarak uygulanması ile DO sırasında VEBF düzeylerinin yükselerek HİF yolağının aktive olması sonucu anjiyogenezin uyarıldığını gösterdik. İyi bir kemik oluşumu için distraksiyona ait biyomekanik faktörler ve anjiyogenezin eşleşmesi gereklidir.

Anahtar sözcükler: Anjiyogenez; distraksiyon osteogenezi; HİF stabilizatörü; VEBF.

Kırık iyileşmesi ve iskelet gelişimi sırasında kemik rejenerasyonu ve anjiyogenezi beraber rol oynar. Bu aşamalarda anjiyojenik faktörler ve hipoksinin gerekli olduğu bilinmektedir.^[1,2] Konjenital büyüme bozuklukları, post-travmatik kemik yetersizliği gibi birçok ortopedik sorun için DO etkili bir cerrahi seçenektir. Kemik rejenerasyonu için en önemli faktörler mevcut vasküler yapıların yeniden şekillenmesi (anjiyogenez) ve yeni damarların oluşumudur (vaskülogenez).^[3,4] Anjiyogenez ve vaskülogenez karmaşık moleküler tepkimeler ile uyarılmakta-

dır. Diğer bir anjiyogenez uyarıcısı olan hipoksi, hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 (HİF-1) adlı transkripsiyon faktörünün stabilizasyonunun yer aldığı mekanizma ile VEBF'nin ekspresyonunu kolaylaştırmaktadır. Böylece yeni oluşan kemik bölgelerine VEBF ile kan damarı invazyonu meydana gelmektedir.

Hipoksik koşullarda osteoblastlar artmış düzeylerde VEBF eksprese etmektedirler. FG-2216 (butil 10-undecenoate; formülü: $C_{15}H_{28}O_2$, molekül ağırlığı: 240.38 g/mol.) prolil-hidroksilaz inhibitörü olarak fonksiyon gös-

Yazışma adresi: Dr. Ahmet Özdel, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, 16059 Görükle, Bursa.

Tel: +90 535 – 769 3736 e-posta: ahmetozdel@gmail.com

Başvuru tarihi: 21.12.2013 **Kabul tarihi:** 10.06.2014

©2015 Türk Ortopedi ve Travmatoloji Derneği

Bu yazının çevrimiçi İngilizce versiyonu

www.aott.org.tr adresinde

doi: 10.3944/AOTT.2015.14.0006

Karekod (Quick Response Code)



termekte ve HIF'i stabilize ederek, HIF'e bağlı mekanizmalarla VEBF ekspresyonunu arttırmaktadır.

Çalışmamızda sıçandaki hızlandırılmış DO modelinde oral olarak uygulanabilen HIF stabilizatörünün (FG-2216) etkisini incelemeyi amaçladık.

Hastalar ve yöntem

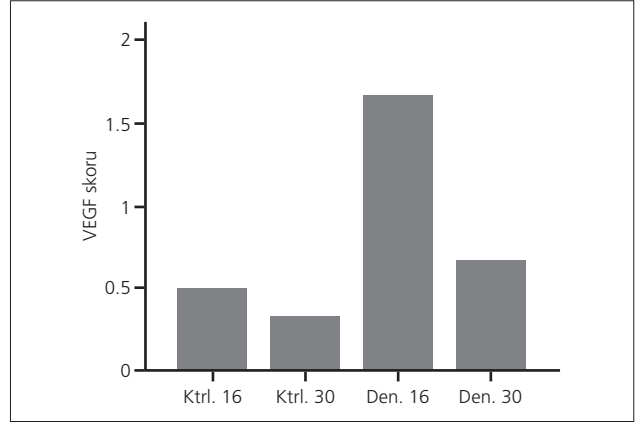
Çalışmamız Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan onay alınarak hazırlandı (Rapor No: 2012-03/02). Ağırlıkları 250 ila 400 g. olan 24 adet Wistar albino sıçan rastgele deney ve kontrol gruplarına ayrıldı. Sıçanların sol tibia orta diyafizlerine osteotomi uygulanarak mini eksternal fiksator ile tespit edildi. Beş günlük latent dönemi takiben günde iki kez 0.4 mm distraksiyon 10 gün boyunca uygulandı.

Deney grubuna deney boyunca 60 mg/kg/gün butil 10-undecenoate (FG-2216®; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, ABD) oral olarak verildi. 16. ve 30. günlerde her iki gruptan altışar adet sıçanın distraksiyon aralığındaki doku örnekleri histolojik ve immünohistokimyasal olarak incelendi. Her iki grup için aynı distraksiyon ritmi uygulandı.

Anestezi için 12 mg/kg %2 ksilazin hidroklorür (Rompun®; Bayer HealthCare) ve 80 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar®; Pfizer Inc., New York City, NY, ABD) intermusküler olarak uygulandı. %10'luk povidon iyot solüsyonu ile cerrahi alan hazırlanarak steril olarak örtüldü. Tibia diyafizlerine proksimal ve distalden perkütan olarak 0.8 mm pinler yerleştirildi. Longitudinal insizyonla orta diyafizden transvers osteotomi yapıldı. Serum fizyolojik ile irrigasyon yapılarak, cilt 4/0 emilmeyen naylon monofilaman sütür ile kapatıldı. Proksimal ve distal pinler fiksatorle tespit edildi. Sıçanlar ayrı ayrı kafeslere konularak serbest kafes aktivitesine bırakıldı. Erken dönemde analjezi için 1-2 mg/kg/gün parasetamol 100 ml içme suyuna eklendi. Hayvanlar günlük yara bakımı ile takip edildi.

Distraksiyon aralığından alınan örnekler %10'luk formaldehit solüsyonu ile fiks edilerek %10 formik asitte ile dekalsifiye edildi. Dehidrasyon ve parafin banyosundan sonra 4 µm'lik kesitler alınarak hematoksilin eozin (HE) ile boyandı. VEBF antikoruna (GeneTex®; GeneTex Inc., Irvine, CA, ABD) kullanılarak anjiyogenez göstermek için VEBF immünohistokimyasal boyama protokolü uygulandı. Distraksiyon aralığındaki osteoblast ve osteositlerin boyanma oranına göre VEBF skorları belirlendi. Skorlar şu şekilde gösterildi; hiç boyanma yok 0; %1-25 boyanma 1; %26-50 boyanma 2; %50'den fazla boyanma 3.

İstatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 20.0



Sekil 1. Grupların ortalama VEGF skorları.

(IBM Corp., Armonk, NY, ABD) programı kullanıldı. Karşılaştırmalar için Pearson ki-kare testi ve Fisher'in kesin testi uygulandı. $P < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Çalışmamızda FG-2216'nın oral kullanımıyla ilgili olarak herhangi bir yan etki gözlenmedi. İki sıçan pin yeri enfeksiyonu nedeniyle deneyin sonuna kadar günlük yara bakımı ile takip edildi.

On altıncı günde deney grubunda 5 sıçanda (%83), kontrol grubunda ise 3 sıçanda (%50); 30. günde ise deney grubunda 4 sıçanda (%67), kontrol grubunda 3 sıçanda (%50) intramembranöz ossifikasyon gözlemlendi. Yine 16. günde deney grubunda 2 sıçanda (%33), kontrol grubunda 1 sıçanda (%16); 30. günde ise deney grubunda 2 sıçanda (%33), kontrol grubunda 3 sıçanda (%50) endokondral ossifikasyon izlendi. On altıncı gündeki ortalama Huddleston füzyon skoru^[5] deney grubunda 6.5 iken, kontrol grubunda 5.16 olarak hesaplandı. Otuzuncu günde her iki gruptaki ortalama füzyon skorları aynıydı (5,33). On altıncı gündeki ortalama VEBF skoru deney grubunda 1.67, kontrol grubunda 0.5 iken, 30. gündeki ortalamalar deney grubunda 0.7, kontrol grubunda 0.3 olarak bulundu. Hem 16. hem de 30. günlerdeki VEBF skorunun deney grubunda daha yüksek olmasına karşılık, sadece 16. günde alınan sonuçları istatistiksel olarak anlamlılık göstermekteydi ($p < 0.05$) (Şekil 1, Tablo 1).

Tartışma

Distraksiyon osteogenezinde oral olarak etkili bir ajanın doğrudan etkisinin gösterilmesi açısından çalışmamız ilk örnektir. Genetik manipülasyonlar ve lokal uygulamalar gibi HIF mekanizmasıyla ilişkili diğer çalışmalarla

Tablo 1. 16. ve 30. gün VEBF skorlarının karşılaştırması.

Rat	Kontrol				Deney			
	16. gün		30. gün		16. gün		30. gün	
	Skor	Ortalama	Skor	Ortalama	Skor	Ortalama	Skor	Ortalama
1.	1	0.5	1	0.3	1	1.7	1	0.67
2.	0		0		2		1	
3.	1		0		2		1	
4.	0		0		1		0	
5.	1		0		2		0	
6.	0		1		2		1	

karşılaştırıldığında çalışmamızda invaziv olmayan bir kimyasal ajan ile anjiyogenezin uyarıldığı görülmektedir. Distraksiyon osteogenezinde FG-2216 gibi oral ajanların uygulanmasının gelecekte daha da önem kazanacağı düşünülmektedir. FG-2216 daha önce anemi tedavisinde kullanılmıştır. Bernhardt ve ark. kronik böbrek yetmezliği (KBY) bulunan hastalara ve gönüllü sağlıklı kişilere oral yoldan FG-2216 uygulamışlar ve KBY'li hastalarda 30.8, gönüllülerde ise 12.7 kat yükselmiş eritropoetin (EPO) düzeyleri bildirmişlerdir.^[6] Bir başka çalışmada HİF düzeylerinin yükselmesini takiben FG-2216 ile spesifik prolil-hidroksilaz inhibisyonu oluşturulmuş ve bunun miyokard enfarktüsünde miyokardiyumun fonksiyonlarını korumak amacıyla kullanılabilmesi belirtilmiştir.^[7] Prolil-hidroksilaz inhibitörü ile kanser hücrelerinin proliferasyonunun azaltıldığı, yani nöroprotektif etki elde edildiği de bir diğer çalışmada aktarılmaktadır.^[8]

Konuyla ilgili birçok çalışmada bifosfonatlar, pamidronik asit, zoledronik asit, 25-dihidroksivitamin D3, büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü-b, insülin benzeri büyüme faktörü gibi etkili ajanlar kullanılmıştır.^[9-14] Bunlara ek olarak, bazı çalışmalarda DO'de kallus dokusuna osteoblast transplantasyonu^[15] ve demineralize kemik matrisinin greft olarak kullanılması gibi uygulamalar da başarılı olmuştur.

Deney grubunda daha yüksek VEBF düzeyleri FG-2216'nın etkinliğine işaret etmektedir. Distraksiyonun sonlanmasını takiben VEBF skorlarının daha iyi olduğu görülmüştür; zira, yeni kemik oluşumuyla korele bir şekilde, distraksiyon aralığındaki anjiyogenez için baskın olan fazın distraksiyon fazı olduğu düşünülmektedir. Sonuçlarımız, periyodik HİF stabilizatörü uygulaması ile toplam distraksiyon zamanının kısaltılabileceğini göstermektedir. Ayrıca, HİF yolağı üzerinden etki eden VEBF'nin aktivasyonu ile EPO uyarılarak, distraksiyon aralığında dolaylı bir kan akımı artışı yaratıp yeni hücrelerin oluşumu için uygun koşulların meydana gelmesini sağlamış olabilir. Anjiyogenezin üst basamak mekaniz-

maları HİF'in baskınlığında meydana geldiği için, Wan ve ark. farelerde HİF yokluğunda kemik yoğunluğunda azalma saptamışlardır.^[16] Kırık iyileşmesi ve kemik defekti modelleri üzerine kurgulanmış bazı çalışmalarda anjiyogenezin lokal VEBF ile uyarıldığı da gösterilmiştir. Fassbender ve ark.'nın çalışmasında, anjiyogenez inhibitörü olarak fumagillin kullanılmış ve sıçanlardaki distraksiyon aralığında 84. günde ciddi oranda atrofik kaynamama olduğu gözlenmiştir.^[17]

Mekanotransdüksiyon fenomeni kapsamındaki proliferatif ve biyosentetik hücre fonksiyonlarının uyarılması net olarak anlaşılmamış olmasına rağmen, yaygın kabul görmüş olan düşünce mekanik stres ne kadar uzun süreliyse yeni kemik oluşumu için gerekli olan sinyal üretiminin de o kadar güçlü olduğudur. Distraksiyon hızı ve sıklığı bu noktada önem arz etmektedir. Distraksiyon aralığındaki mikroçevre, distraksiyon sıklığının arttığı ancak hızın sabit kaldığı koşullarda iyi korunmaktadır; zira, mekanik uyarılmanın frekansının artması yeni kemik ve damar oluşumunu da arttıracaktır.^[18] Biz sıçanlarda geleneksel olarak kullanılan distraksiyon hızından biraz daha fazla olan 0.8 mm/gün hızını çalışmamızda uyguladık. Distraksiyon hızı ve ritmi ile ilişkili yayınlar bulunmakla birlikte bunların herhangi birinde optimum bir orandan söz edilmemektedir. Paccione ve ark.'nın çalışmasında, 1 mm/gün distraksiyon hızı kullanılmış ve sıçanların mandibula kemiklerinde yetersiz anjiyogenez ve kemik oluşumu gözlemlenmiş olup, 0.5 mm/gün hızında ise mükemmel sonuçlar alınmıştır.^[19] Başka bir çalışmada tavşandaki DO modelinde hızlı distraksiyon ise yetersiz anjiyogenez ile sonuçlanmıştır.^[20]

Klinik ve deneysel çalışmalarda 1 mm/gün üzerindeki distraksiyon hızlarında periostun, yeni oluşmakta olan damarların ve kemik oluşumunun zarar gördüğü, bunun sonucunda da kaynamada gecikme ya da kaynamama gözlemlendiği bildirilmiştir.^[19] Çalışmamızda FG-2216 uygulanmasına bağlı olarak VEBF düzeylerinde artış elde ettik; ancak, HİF stabilizasyonuna bağlı VEBF aktivas-

yonunun DO'ya etki eden uygun biyomekanik koşulların eksikliğini de dengeleyememiş olduğunu fark ettik. Oluşturduğumuz distraksiyonun ritmi mikroçevreyi olumsuz etkilemesiyle oluşan genel blokaj sonucunda yetersiz kemik oluşumu meydana gelmişti. Bununla birlikte, yine de, distraksiyon aralığında artmış oranda VEBF aktivitesi saptadık. Zayıf organizasyonlu ve kan akımı az olan granülasyon dokusunun erken dönemde oluşmasının nedeni hızlı distraksiyona bağlı olduğundan,^[20] DO modelimizdeki distraksiyon aralığındaki yetersiz kemik kalitesinin distraksiyon ritmimizle ilişkili olduğunu düşünüyoruz. Distraksiyon sürecinde granülasyon dokusu, fibrokartilaj doku ve kistler distraksiyon aralığını doldurmakta ve göreceli olarak daha az kemik oluşumu görülmektedir. Azalmış osteoblast aktivitesi, kırık dokular ve kistler distraksiyon aralığında yeni kemik oluşumuna müdahale ederek ortamın kaynamama ile sonuçlanmasına yol açmaktadırlar.^[21-23] Her bir distraksiyon hamlesi ile kemiğin osteotomi yapılmış iki tarafında gerilim artmakta ve rejenerat üzerinde mekanik stres oluşmaktadır. Sabit bir günlük distraksiyon hızıyla, frekans artırılarak aralık çevresinde gerilim kararlı bir yapıda tutulabilir ve bu durumun rejenerat çevresindeki yumuşak dokuda daha az hasar yaratacağı düşünülebilir. Bu çalışmada düşük frekanslı (günde iki kere) hızlandırılmış distraksiyon oranı mekanik mikroçevreyi değiştirerek rejenerat üzerinde olumsuz etkilere yol açmıştır.

Sonuç olarak, çalışmamızda FG-2216 kullanımında HIF mekanizması ile VEBF düzeylerinde artış ve anjiyogenezde uyarılma gerçekleşmektedir. Hızlandırılmış distraksiyona bağlı oluşan olumsuz biyomekanik koşullar sadece VEBF uyarımı ile dengelenememekte, bunun sonucunda da yeni kemik oluşumu sekteye uğramaktadır. Distraksiyon osteogenezinde VEBF uyarımının oral bir ajanla oluşturulması, gelecekteki ekstremite uzatma cerrahisi prosedürleri açısından umut vericidir. Anjiyogenez ve farklı biyomekanik koşullar arasındaki etkileşimlerin araştırılması için DO üzerine yeni deneysel çalışmalar gerekmektedir.

Çıkar örtüşmesi: Çıkar örtüşmesi bulunmadığı belirtilmiştir.

Kaynaklar

1. Trueta J, Trias A. The vascular contribution to osteogenesis. IV. The effect of pressure upon the epiphyseal cartilage of the rabbit. *J Bone Joint Surg Br* 1961;43:800-13.
2. Trueta J, Buhr Aj. The Vascular Contribution To Osteogenesis. V. The Vasculature Supplying The Epiphyseal Cartilage In Rachitic Rats. *J Bone Joint Surg Br* 1963;45:572-81.
3. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;386:671-4.
4. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 2003;9:685-93.
5. Huddleston PM, Steckelberg JM, Hanssen AD, Rouse MS, Bolander ME, Patel R. Ciprofloxacin inhibition of experimental fracture healing. *J Bone Joint Surg Am* 2000;82:161-73.
6. Bernhardt WM, Wiesener MS, Scigalla P, Chou J, Schmieder RE, Günzler V, et al. Inhibition of prolyl hydroxylases increases erythropoietin production in ESRD. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:2151-6.
7. Philipp S, Jürgensen JS, Fielitz J, Bernhardt WM, Weidemann A, Schiche A, et al. Stabilization of hypoxia inducible factor rather than modulation of collagen metabolism improves cardiac function after acute myocardial infarction in rats. *Eur J Heart Fail* 2006;8:347-54.
8. Ma TC, Langley B, Ko B, Wei N, Gazaryan IG, Zareen N, et al. A screen for inducers of p21(waf1/cip1) identifies HIF prolyl hydroxylase inhibitors as neuroprotective agents with antitumor properties. *Neurobiol Dis* 2013;49:13-21.
9. Little DG, Cornell MS, Briody J, Cowell CT, Arbuckle S, Cooke-Yarborough CM. Intravenous pamidronate reduces osteoporosis and improves formation of the regenerate during distraction osteogenesis. A study in immature rabbits. *J Bone Joint Surg Br* 2001;83:1069-74.
10. Okazaki H, Kurokawa T, Nakamura K, Matsushita T, Mameda K, Kawaguchi H. Stimulation of bone formation by recombinant fibroblast growth factor-2 in callotasis bone lengthening of rabbits. *Calcif Tissue Int* 1999;64:542-6.
11. Raschke MJ, Bail H, Windhagen HJ, Kolbeck SF, Weiler A, Raun K, et al. Recombinant growth hormone accelerates bone regenerate consolidation in distraction osteogenesis. *Bone* 1999;24:81-8.
12. Stewart KJ, Weyand B, van't Hof RJ, White SA, Lvoff GO, Maffulli N, et al. A quantitative analysis of the effect of insulin-like growth factor-1 infusion during mandibular distraction osteogenesis in rabbits. *Br J Plast Surg* 1999;52:343-50.
13. Williams PR, Smith NC, Cooke-Yarborough C, Little DG. Bisphosphonates and nephrocalcinosis in a rabbit leg lengthening model: a histological and therapeutic comparison. *Pharmacol Toxicol* 2001;89:149-52.
14. Yamane K, Okano T, Kishimoto H, Hagino H. Effect of ED-71 on modeling of bone in distraction osteogenesis. *Bone* 1999;24:187-93.
15. Tsubota S, Tsuchiya H, Shinokawa Y, Tomita K, Minato H. Transplantation of osteoblast-like cells to the distracted callus in rabbits. *J Bone Joint Surg Br* 1999;81:125-9.
16. Wan C, Gilbert SR, Wang Y, Cao X, Shen X, Ramaswamy G, et al. Activation of the hypoxia-inducible factor-1alpha pathway accelerates bone regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:686-91.
17. Fassbender M, Strobel C, Rauhe JS, Bergmann C,

- Schmidmaier G, Wildemann B. Local inhibition of angiogenesis results in an atrophic non-union in a rat osteotomy model. *Eur Cell Mater* 2011;22:1-11.
18. Ji B, Jiang G, Fu J, Long J, Wang H. Why high frequency of distraction improved the bone formation in distraction osteogenesis? *Med Hypotheses* 2010;74:871-3.
19. Paccione MF, Mehrara BJ, Warren SM, Greenwald JA, Spector JA, Luchs JS, et al. Rat mandibular distraction osteogenesis: latency, rate, and rhythm determine the adaptive response. *J Craniofac Surg* 2001;12:175-82.
20. Djasim UM, Mathot BJ, Wolvius EB, van Neck JW, van der Wal KG. Histomorphometric comparison between continuous and discontinuous distraction osteogenesis. *J Craniomaxillofac Surg* 2009;37:398-404.
21. Aronson J, Shen XC, Skinner RA, Hogue WR, Badger TM, Lumpkin CK Jr. Rat model of distraction osteogenesis. *J Orthop Res* 1997;15:221-6.
22. Aronson J. Experimental and clinical experience with distraction osteogenesis. *Cleft Palate Craniofac J* 1994;31:473-82.
23. Li G, Simpson AH, Kenwright J, Triffitt JT. Assessment of cell proliferation in regenerating bone during distraction osteogenesis at different distraction rates. *J Orthop Res* 1997;15:765-72.