



Pentoksifilin segmenter kemik kayıpları ve anjiogenezis üzerine etkisi

Gökhan ÇAKMAK¹, Mehmet Şükrü ŞAHİN¹, B. Handan ÖZDEMİR², Emre KARADENİZ¹

¹Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Antalya

²Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Ankara

Amaç: Bu çalışmanın amacı; pentoksifilin (PTX) anjiogenezis ve sıçan radius diafizi “critical-sized” segmenter kemik kaybı modelinde iyileşme üzerine etkisini radyolojik ve histolojik derecelendirme sistemleri kullanılarak değerlendirilmesidir.

Çalışma planı: Bu çalışmaya 24 female Sprague Dawley sıçan (ağırlık: 300±20 gram) katılmıştır ve 4 gruba ayrılmıştır. Sıçanların radius diafizlerinde “critical-sized” segmenter kemik kaybı oluşturuldu. Grup 1’de morselize iliak krest otogreftleri segmenter kemik defektini doldurmada kullanıldı. Grup 2’de segmenter kemik defekti morselize iliak krest otogreftleri ile dolduruldu ve günlük intraperitoneal olarak 25 mg/kg PTX uygulandı. Grup 3’te kemik defekti doldurulmadı. Grup 4’te kemik defekti doldurulmadı ve günlük intraperitoneal olarak 25 mg/kg PTX uygulandı. Postoperatif sekizinci haftada sıçanlar feda edildi. Defektler radiografik, histolojik ve immünokimyasal metodlar ile değerlendirildi.

Bulgular: Group 1 ve 2 arasında radyolojik değerlendirme sonucunda ($p=0.003$) ve defekt bölgesinde kaynama kalitesi açısından ($p=0.01$) belirgin farklılık izlendi. Kaynama kalitesi grup 4’te grup 3’e göre fazlaydı ($p=0.01$). CD-31 ve VEGF seviyeleri grup 2’de grup 3 ve 4’e göre fazlaydı.

Çıkarımlar: Radyolojik ve histolojik parametrelere göre; pentoksifilin anjiogenezis ve sıçan radius diafizi “critical-sized” segmenter kemik kaybı modelinde iyileşme üzerine olumlu etkisi bulunmaktadır.

Anahtar sözcükler: Kemik grefti; kemik iyileşmesi; kortikal defekt; pentoksifilin.

Anjiogenezis; farklı kompleks sitokinlerin etkileşimi ile gelişen kemik oluşumu ve kırık iyileşmesinin en önemli ve kritik basamaklarından biridir. Kemik iyileşmesinde gecikme ve kaynamama gibi komplikasyonlar spesifik anjiogenik faktörlerin konsantrasyonlarındaki değişiklikler ile ilişkili olabilir. Pentoksifilin yaygın klinik kullanımı olan bir ksantin yan ürünüdür.^[1] Reperfüzyon periodunda lökosit adezyonunu baskılayarak ve ekstremitelere kan akımını artırarak reperfüzyon ilişkili membrana yaralanması ve doku ödemi azaltır.^[2,3]

Bu çalışmanın amacı; pentoksifilin (PTX) anjiogenezis ve sıçan radius diafizi “critical-sized” segmenter kemik kaybı modelinde iyileşme üzerine etkisini radyolojik ve histolojik derecelendirme sistemleri kullanılarak değerlendirilmesidir.

Gereç ve yöntem

Bu çalışma üniversitemiz Etik kurul onayı alındıktan sonra Hayvan Araştırma Laboratuvarlarında yapılmıştır.

Yazışma adresi: Dr. Gökhan Çakmak, Başkent Üniversitesi Alanya Araştırma ve Uygulama Merkezi, Saray Mah., Yunusemre Cad., No: 1, 07400 Alanya, Antalya.

Tel: +90 242 – 510 25 25 e-posta: gokhancakmak75@gmail.com

Başvuru tarihi: 19.03.2015 **Kabul tarihi:** 17.05.2015

©2015 Türk Ortopedi ve Travmatoloji Derneği

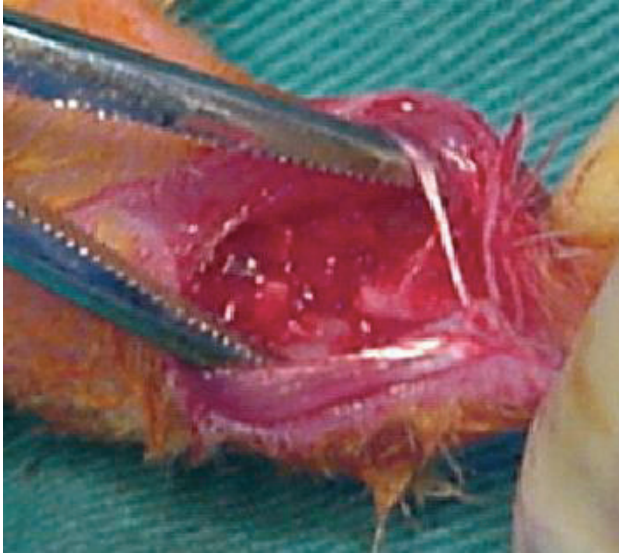
Bu yazının çevrimiçi İngilizce versiyonu

www.aott.org.tr adresinde

doi: 10.3944/AOTT.2015.15.0158

Karekod (Quick Response Code)





Şekil 1. Radius diafizinde oluşturulan "Critical-sized" kemik defekti. [Bu şekil, derginin www.aott.org.tr adresindeki çevrimiçi versiyonunda renkli görülebilir.]

Çalışmaya ortalama ağırlığı 300 ± 20 gram olan 24 dişi Sprague-Dawley sıçan katılmıştır. Sıçanlar aynı enstitüde 4 grup olarak kafeste tutulmuştur. Tüm cerrahi uygulamalar aynı cerrah tarafından ketamin ve ksilazin anestezisi altında yapılmıştır.

"Critical-sized" kemik defekti modeli başka çalışmalarda literatürde belirtilmiştir. Sıçanların sağ üst ekstremiteleri literatürdeki diğer çalışmalarda belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Sıçanların sağ üst ekstremiteleri traş

edilmiş, hazırlanmış ve steril olarak örtülmüştür. Radius üzerine longitudinal bir insizyon yapıp üzerindeki dokular disseke edilmiştir. Radius diafizinin orta 1/3'ü osteotomize edilip kemiğin çapının iki katından fazla olacak şekilde segmenter defekt oluşturulmuştur (Şekil 1).^[4,6-8] Ardından defekt salin solüsyonu ile yıkanmıştır.

Cerrahiye takiben randomize olarak sıçanlar 4 deney grubuna ayrılmıştır:

Grup 1'de morselize iliak krest otogreftleri segmenter kemik defektini doldurmada kullanıldı. Grup 2'de segmenter kemik defekti morselize iliak krest otogreftleri ile dolduruldu ve günlük intraperitoneal olarak 25 mg/kg PTX uygulandı. Grup 3'te kemik defekti doldurulmadı. Grup 4'te kemik defekti doldurulmadı ve günlük intraperitoneal olarak 25 mg/kg PTX uygulandı. Cerrahiye takiben cilt monofilaman 4-0 prolen ile dikildi.

Postoperatif sekizinci haftada yüksek doz ketamin ve ksilazin kullanılarak sıçanlar feda edildi. Kallus dokularına zarar vermeden sağ üst ekstremiteleri disseke edildi.

Her örneğin anteroposterior radyografileri çekildi. (Şekil 2a-c). Kemik kaynama Cook ve arkadaşlarının radyografik değerlendirme çizelgesi ile yapıldı.^[4] Daha önceki çalışmalarda radyografik değerlendirme için herhangi bir özel cihaza gerek olmadığı gösterilmiştir. Bu yüzden radyo-dansite değerlendirmesi için özel bir cihaz kullanılmamıştır.^[4-6,9]

Örnekler %10 formaldehit solüsyonunda 24 saat bekletildikten sonra 10 gün boyunca %10 formik asitte



Şekil 2. (a) Morselize iliak krest otogreft ile doldurulan segmenter kemik defektinin radyografik görüntüsü. (b) Morselize iliak krest otogreft ile doldurulan ve intraperitoneal 25 mg/kg/gün PTX verilen segmenter kemik defektinin radyografik görüntüsü. (c) Doldurulmamış segmenter kemik defektinin radyografik görüntüsü.

bekletilerek dekalsifiye edildi. 5µm kesitler hazırlandı ve hematoxylin-eosin (HE) kullanılarak örnekler boyandı. Histopatolojik inceleme ışık mikroskobu altında yapıldı. Kemik iyileşmesi defekt bölgesinde değerlendirildi. Histolojik değerlendirme Salkeld ve arkadaşları tarafından tanımlanan histopatolojik değerlendirme çizelgesine göre yapıldı.^[6,9,-11]

İmmunohistokimyasal değerlendirme; CD-31 ve VEGF antikorları (®Leica Biosystems) kullanılarak anjiogenezisi kanıtlamak için yapıldı. CD-31; 130 kDa integral membran proteinidir ve immunoglobulin super ailesinin hücre hücreye adezyonunu yöneten bir üyesidir. PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) olarak da bilinir ve kemik iliği kökenli hemtopetik kök hücreler ve emriyonik kök hücrelerde bulunurlar. CD31 kontrollü endotelial hücre-hücre etkileşimleri anjiogeneziste görülür.^[12-15]

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) vasküler endotelial hücrelerin mitozunu uyarır, endotelial hücrelerin proliferasyonunu indükler, hücre migrasyonunu destekler ve apoptozu inhibe eder. In vivo VEGF kan damarlarını geçirgenleştirmesinin yanında anjiogenezis indükler ve damarlanmanın regülasyonunda rol oynar.

İmmunohistokimyasal değerlendirmede 3-µm kalınlığında kesitler deparafinize edildi ve Poly-L-Lysine kaplı slaytlara gömüldü. Kesitler sitrat tampon çözeltisi (0.01 mol/L, pH 6) içine konuldu ve mikrodalga fırın içinde maksimum güçte (700 W) 15 dakika ısıtıldıktan sonra oda sıcaklığında 20 dakikada soğutuldu. Doku kesitleri CD31 ve VEGF primer antikorları içinde oda sıcaklığında nemlendirilmiş bir unitede 20 dakika inkübe edildi. Tampon çözeltisi yıkandıktan sonra slaytlar ilk olarak biotinylated goat antipolyvalent içinde 15 dakika ve ek olarak 15 dakika oda sıcaklığında streptavidin peroxidase içinde inkübe edildi. Slaytlar 12 dakika diaminobenzidine tutulduktan sonra zıt olarak hemotoksilen ile boyandı. İmmun boyama için pozitif ve negatif kontroller yapıldı.

CD31 tarafından belirginleşen mikro damarların yoğunluğu; x200 büyütme, 0.25 mm² değerlendirme alanı bulunan göz ekranı altında kafes şeklinde ölçüm çizgileri ile ölçüldü. Sonuçlar birim alana düşen mikro damar sayısı olarak ölçüldü.

VEGF semikantitatif olarak 1'den 3+'a kadar aşağıdaki şekilde derecelendirildi:

1+ ilgili biopsi alanında %25'ten az boyalı hücreyi, 2+ ilgili biopsi alanında %25-50 arasında boyalı hücreyi ve 3+ ilgili biopsi alanında %50'den fazla boyalı hücreyi gösterir.

İstatistiksel değerlendirme; Statistical Program for Social Sciences bilgisayar programı (SPSS for windows,

Inc., Chicago, IL, USA) ile yapıldı. Devamlı değişkenler ortalama± SD olarak ve kategorize değişkenler sayılar ve yüzdeler olarak verilmiştir. Veriler, normal dağılım için Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirilmiştir. Devamlı değişkenler Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır. Kruskal Wallis testi gruplar arasındaki kategorize değişkenlerin karşılaştırılması için kullanılmıştır.

The Kruskal Wallis test was used for comparison of the categorical variables between groups. Tüm farklılık testleri çift kuyrukludur. P değerinin <0.05 olması istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

Bulgular

Kruskal Wallis testine göre tüm gruplar arasında belirgin radyolojik farklılık olduğu görüldü (p<0.001). Radyolojik olarak kemik kaynaması sadece grup 1 ve 2'de görüldü (p=0.006) ve grup1 ve 2 arasında belirgin farklılık izlendi (p=0.006).

Histolojik değerlendirmede grup 2, grup 1'e göre daha iyi kemik kaynamasına sahipken grup 4, grup 3'e göre daha iyi kemik kaynamasına sahiptir. Korteks yapısı-remodelizasyonu ve greft inkooperasyonu-yeni kemik oluşumuna göre grup 1-2 ve grup 3-4 arasında anlamlı farklılık görülmedi

İmmunohistokimyasal değerlendirme göstermiştir ki; CD-31 boyama açısından grup 1 ve 2 arasında anlamlı fark yokken grup 1 ve 2 arasında VEGF boyaması açısından anlamlı fark bulunmaktadır (kaynama, p=0.007; korteks, p=0.031; greft, p=0.031). Ek olarak grup 2-3 ve grup 3-4 arasında; CD-31 seviyeleri (p=0.004 ve 0.026) ve VEGF boyama (kaynama, p=0.03 ve 0.002; korteks, p=0.01 ve 0.014; greft, p=0.008 ve 0.006) açısından anlamlı farklılık bulunmuştur. CD-31 boyamada grup 3-4 arasında (p=0.017) belirgin farklılık bulunurken VEGF dereceleri arasında fark yoktur. CD-31 seviyesi en fazla grup 2'dedir (Tablo 1).

Grup 1 ve 2'de kemik defekt alanında kallus oluşumu ve mineralizasyon gözlenmiştir. Grup 2'de belirgin osteoblastik aktivite görülmüştür (Şekil 3).

Tartışma

A.B.D'de yılda 33 milyon insan kas iskelet yaralanmalarından etkilenmektedir ve kemik kırıkları insidansı yılda yaklaşık 6 milyondur.^[16,17] Kemik kırıkları hem fonksiyon kaybına hem de üretkenliğin azalmasına bağlı belirgin ekonomik etkilere neden olurken tedavisi yeterli ve zamanında kırık iyileşmesini sağlamayı amaçlamaktadır. Kırık anında azalmış damarlanma ile oksijen basıncında azalma ve pH'da düşmeye bağlı hiposik nekrotik alanlar oluşmaktadır. Bu periyod sonrası kırık hattından

Tablo 1. Gruplarda radyolojik, histolojik ve immünohistokimyasal dağılımın değerlendirilmesi.

Derece	Grup 1		Grup 2		Grup 3		Grup 4		p ¹	p ²	p ³	p ⁴
	n	%	n	%	n	%	n	%				
X-ray												
0	0	0	0	0	5	100	6	100				
1	1	16.7	0	0	0	0	0	0				
2	4	66.6	0	0	0	0	0	0	0.006	1.0	<0.001	<0.001
3	1	16.7	3	50	0	0	0	0				
4	0	0	2	33.3	0	0	0	0				
5	0	0	1	16.7	0	0	0	0				
Histokaynama												
1	3	50	0	0	4	80	0	0				
2	3	50	2	33.3	1	20	6	100	0.011	0.009	0.145	0.003
3	0	0	4	66.7	0	0	0	0				
Histokorteks												
0	0	0	0	0	3	60	2	33.3	0.784	0.313	0.008	0.045
1	3	50	4	66.7	2	40	3	50				
2	3	50	1	16.7	0	0	1	16.7				
3	0	0	1	16.7	0	0	0	0				
Histograft												
0	1	16.7	0	0	4	80	2	33.3	0.676	0.106	0.014	0.046
1	2	33.3	3	50	1	20	2	33.3				
2	0	0	2	33.3	0	0	2	33.3				
3	1	16.7	1	16.7	0	0	0	0				
4	2	33.3	0	0	0	0	0	0				
Histokaynama- VEGF												
0	0	0	0	0	1	20	0	0				
1	3	50	0	0	2	40	3	50	0.007	0.545	0.013	0.005
2	2	33.3	0	0	2	40	3	50				
3	1	16.7	6	100	0	0	0	0				
Histokorteks- VEGF												
0	2	33.3	0	0	2	40	1	16.7				
1	2	33.3	1	16.7	3	60	3	50	0.031	0.190	0.071	0.025
2	2	33.3	2	33.3	0	0	2	33.3				
3	0	0	3	50	0	0	0	0				
Histograft- VEGF												
0	2	33.3	0	0	3	60	2	33.3				
1	2	33.3	1	16.7	2	40	4	66.7	0.031	0.399	0.010	0.011
2	2	33.3	2	33.3	0	0	0	0				
3	0	0	3	50	0	0	0	0				
CD31, ortalama±SS	33.1±11.3		35.0±11.1		11.7±5.7		18.1±7.7		0.310	0.017	<0.001	<0.001

p¹: Grup I ve II karşılaştırılması; p²: Grup III ve IV karşılaştırılması; p³: Grup I-II ve III-IV karşılaştırılması; p⁴: Tüm grupların karşılaştırılması; X-ray: Radyografik değerlendirme; Histokaynama: Histolojik kemik kaynama kalitesi; Histokorteks: Korteks oluşumu -remodelling; Histograft: Graft inkooperasyonu ve yeni kemik oluşumu; VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktörü.

sitokinler salgılanır ve iyileşme periyodu başlar. Vaskülarizasyon bu erken evrede çok önemlidir ve anjiogenezisi başlatan sitokinler tarafından sağlanır. Anjiogenesis yaralanmamış kemik alanlarındaki kapiller dolaşım ile idare edilir. Kemiğin en önemli vasküler alanlarından biri erken kırık iyileşmesinde önemli bir rol oynayan periosteal dolaşımı sağlayan periosteal arterdir.^[11,16,18,19]

Kırık iyileşmesi yara iyileşmesine yanıtın benzersiz bir tipidir. Kırıkların büyük kısmı güzel iyileşirken bazıları tedaviye direnç gösterir ve kaynamama veya malunion ile sonuçlanır. Bazı olgularda kırık hattının kemik grefti materyalleri ile desteklenmesi gerekmektedir.^[17,20,21] Son dekatlarda alternatif biyofizikal ve biyolojik tedavi yöntemleri iyileşmemiş kırık tedavisi için gelişt-



Şekil 3. Grup 2'de ratta Osteoblastik aktivite, kallus oluşumu ve vaskülarizasyon, HE, x12.5. [Bu şekil, derginin www.aott.org.tr adresindeki çevrimiçi versiyonunda renkli görülebilir.]

rilmiştir. Bu yöntemler; mekanik, elektrik, ultrasound metodları, büyümeyi uyaran proteinler, osteojenik, osteokondüktif ve osteoindüktif metodlardır.^[22-24] Bu çalışmamızda pentoksifilin segmenter kemik defektlerinin iyileşmesinde adjuvant etkisini araştırdık

Pentoksifilin (PTX) bir ksantin derivesidir. Reperfüzyona bağlı membran hasarı ve doku ödemeine etki ettiği kanıtlanmakla beraber lökosit adezyonunu baskılayarak reperfüzyon aşamasında alt ekstremitenin kan akımını arttırdığı da gösterilmiştir.^[2,3] Bununla beraber iskemi-reperfüzyon yaralanmasına nötrofil sekestrasyonu, reaktif oksijen artıkları ve trombosit aktivasyonu ile etki ettiği gösterilmiştir.^[3,25]

In vitro ve *in vivo* çalışmalar; TNF- α dahil olmak üzere sitokinlerin oluşumunu belirgin olarak düşürdüğünü göstermiştir. İlacın TNF- α seviyesini düşürmesi siklik adenozin monofosfatı (c-AMP) düşürme kabiliyetine bağlıdır. Birçok etkisi olmasının bulunması nedeniyle araştırmalar ve klinik çalışmalar yapılmıştır. Hayvan deneylerinde PTX'in spinal kord iskemisinde ve karaciğer iskemi/reperfüzyon yaralanmasında yararlı etkisi olduğunu göstermiştir.^[1,24-32] Hayvan spinal kord iskemisi modelinde Zhu ve arkadaşları PTX'in nekroz ve apoptozu önleyerek spinal kordda iskemi yaralanmasına karşı korunmayı desteklediği sonucuna varmışlardır.^[1]

Emreca ve arkadaşları yaptıkları *in vivo* çalışmada iloprost ve PTX'in iskelet kası iskemisi erken dönemde iskemi/reperfüzyon yaralanmasını azalttığını göstermiştir.^[3]

Delenian ve arkadaşları PTX ve E vitamininin klodronat ile kombinasyonunun radyasyona bağlı osteonekroz ve fibrozisi azaltmasını incelemişlerdir ve bu kombinasyonun sternokostal ve mandibular osteoradyonekrozu azlattığını rapor etmişlerdir. PTX ve E vitamininin klodronat ile kombinasyonunun uzun dönem kullanımının kalıcı osteoradyonekroz tedavisinde efek-

tif, güvenli ve faydalı bir tedavi olduğu; belirgin semptomlarda düzelleme ile mukozaya ve kemik iyileşmesine etki ettiği sonucuna varmışlardır.^[33] Bu çalışmamızda biz de PTX'in anjiogenezis ve kemik iyileşmesinde benzer etkileri olduğu sonucuna vardık.

Bazı *invitro* çalışmalar intrasellüler siklik AMP (c-AMP) düzeylerinde artışın osteoblastların kemik oluşturma aktivitelerine etki ettiğini göstermiştir.^[34] Kimmel ve arkadaşları^[35] ile Shen ve arkadaşları^[36] c-AMP ve c-AMP'ye bağımlı protein kinazın aralıklı paratiroid hormon (PTH) atımına sıçan kemiğinin büyüme yanıtını tetiklediğini gözlemlemiştir. Ek olarak adenilat siklaz ile c-AMP sentezinin ve c-AMP'in seviyesi; inaktif formu olan 5' AMP'ye siklik nükleotid fosfodiesterazlar (PDE) ile hidrolizinin seviyesi ile regüle edilir. Fosfodiesteraz inhibitörleri; c-AMP'nin PDE'lar ile yıkımını azaltarak c-AMP seviyelerini artırmada etkilidir. Bu nedenle PTX gibi PDE inhibe eden bileşimlerin verilmesi intrasellüler c-AMP seviyelerini arttırarak kemik kütlelerinin artmasını sağlayabilir.^[37]

Kinoshita ve arkadaşları^[38] PTX verilmesinin dansitometri analizinde vücut ağırlığını değiştirmeden doza bağımlı olarak sıçan femur ve vertebralarında radyografilerde dansiteyi arttırdığını rapor etmişlerdir. Horiuchi ve arkadaşları^[39] bone morphogenetic protein (BMP)-laden diskleri implante ettikleri günden itibaren 3 hafta günlük subkutan PTX enjekte etmişlerdir ve 50 mg/kg/gün PTX enjekte edilen farelerde kemik dokunun daha büyük ve daha fazla kalsiyuma sahip olduğunu bulmuşlardır. Bununla beraber düşük doz PTX ile (5 ve 25 mg/kg/gün) tedavi edilenlerde kontrol ve PTX tedavi grubu arasında kemik dokular arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Horiuchi ve arkadaşları^[39] tarafından yapılan çalışmanın verilerine göre PTX'in BMP-uyarımlı ektopik yeni kemik oluşumu üzerine anabolic etkisi bulunmaktadır. Ayrıca aynı çalışmada osteotomi alanında belirgin yeni kemik oluşumu için 25 mg/kg/gün PTX uygulanması sonrası elde edilebileceği vurgulanmıştır.

PTX'in neden olduğu kemik yapımının mekanizması hala tam olarak bilinmemektedir; ancak ilacın farmakolojik etkilerine bağlı olabilir. PTX'in TNF- α seviyesini azaltma etkisi c-AMP'yi arttırması ile ilişkili olabilir. TNF- α ; kemik rezorpsiyonunu ve kemik yapımını inhibe eden bir sitokindir. PTX'e bağlı TNF- α 'ın kemik iliginde yapımının azalması BMD'de artışa neden olur. Ek mezenşimal hücreleri kondrosit ve osteoblastlara indükleyen BMP'lerin yolundan PDE inhibitörleri kemik oluşumunu arttırabilir.^[40] BMP-yanıt veren hücrelerdeki yüksek intrasellüler c-AMP seviyeleri BMP'nin hücrelere etkilerini arttırır ve hücre farklılaşmasını uyararak kemik oluşumuna yol açar.^[37,41]

Kurtoglu ve arkadaşları hamilelik ve laktasyon sırasında maternal nicotine maruziyetinin neonatal sıçan kemik oluşumuna etkilerini ve PTX'in koruyucu etkisini incelemişlerdir. Sonuç olarak PTX destek tedavisi maternal nikotin maruziyetinin BMD ve doğum ağırlığı üzerine yan etkilerini (az doğum ağırlığı, fazla doğum kilosu, kemik uzaması ve artmış apoptoz gibi) önlediği sonucuna varmışlardır.^[37]

Aydın ve arkadaşları 2 ve 3 haftalık periyodlar sonrasında kapalı femur kırığı üzerine PTX'in etkisini incelemişlerdir. Erken dönemde histolojik olarak PTX kırık iyileşmesini hızlandırırken bu etkinin uzun dönemde azaldığı sonucuna varmışlardır. Ek olarak PTX grubunda enfeksiyonun fazla olduğunu belirtmişlerdir.^[42] Bizim çalışmamız bu çalışmadan daha uzun süreli bir çalışmadır ve PTX'in greft inkooperasyonunu histolojik ve radyolojik olarak arttırdığını göstermektedir. Açık cerrahi ve greftleme yapılmasına rağmen sıçanlarda enfeksiyon bulgusuna ratlanmamıştır.

Bu çalışmamızda PTX uygulanan sıçanların segmenter kortikal defektlerinde radyolojik olarak greft inkooperasyonu ve histolojik olarak kaynama kalitesi daha iyi olarak bulunmuştur. Ek olarak greft uygulanmayan PTX uygulanan kortikal defekt grubunda kontrol grubuna göre kaynama kalitesinde daha fazla gelişme gözlemlenmiştir (Grup 3). Bu bulgular; PTX'in farmakolojik etkileşimi sonucu olarak osteogenez ve anjiogenezise neden olan hücre sel yanıtı bağlı olabilir. Anjiogenezis kemik iyileşmesinin önemli basamaklarından biridir. PTX'e maruz kalan gruplar yüksek CD-31 ve VEGF seviyeleri ile yüksek anjiogenezise sahiptirler.

Sonuç olarak, PTX segmenter kemik kayıplarında kemik iyileşmesini arttırmaktadır ve defect alanında damarlanma ve anjiogenezisi uyarabilmektedir. Kemik iyileşmesinde birçok tedavi olmasına rağmen PTX gibi adjuvan ajanların etkileri göz ardı edilmemelidir. Bu etkiler üzerine ileri *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar yapılmalıdır.

Çıkar örtüşmesi: Çıkar örtüşmesi bulunmadığı belirtilmiştir.

Kaynaklar

- Zhu DJ, Xia B, Bi Q, Zhang SJ, Qiu BS, Zhao C. Functional protection of pentoxifylline against spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits: necrosis and apoptosis effects. *Chin Med J (Engl)* 2008;121:2444-9.
- Kishi M, Tanaka H, Seiyama A, Takaoka M, Matsuoka T, Yoshioka T, et al. Pentoxifylline attenuates reperfusion injury in skeletal muscle after partial ischemia. *Am J Physiol* 1998;274:H1435-42.
- Emreçan B, Tulukoğlu E, Bozok S, Aksun M, Yağdı S, Özcan AV, et al. Iloprost and pentoxifylline attenuate ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle in rabbit model. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* 2008;14:182-7.
- Cook SD, Baffes GC, Wolfe MW, Sampath TK, Rueger DC. Recombinant human bone morphogenetic protein-7 induces healing in a canine long-bone segmental defect model. *Clin Orthop Relat Res* 1994;301:302-12.
- Boden SD, Zdeblick TA, Sandhu HS, et al. The use of rhBMP-2 in interbody fusion cages. Definitive evidence of osteoinduction in humans: a preliminary report. *Spine (Phila Pa 1976)* 2000;25:376.
- Salkeld SL, Patron LP, Barrack RL, Cook SD. The effect of osteogenic protein-1 on the healing of segmental bone defects treated with autograft or allograft bone. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83-A:803-16.
- Ozturk AM, Cila E, Kanatli U, Isik I, Senkoğlu A, Uzunok D, Piskin E. Treatment of segmental bone defects in rats by the stimulation of bone marrow osteo-progenitor cells with prostaglandin E2. *Int Orthop* 2005;29:73-7.
- Çakmak G, Bolukbasi S, Simsek A, Erdem O, Yılmaz G, Senkoğlu A. Effect of synthetic cell-binding peptide on the healing of cortical segmental bone defects. *Saudi Med J* 2006;27:777-80.
- Bostrom M, Lane JM, Tomin E, Browne M, Berberian W, Turek T, et al. Use of bone morphogenetic protein-2 in the rabbit ulnar nonunion model. *Clin Orthop Relat Res* 1996;327:272-82.
- Bostrom MP, Yang X, Kennan M, Sandhu H, Dicarolo E, Lane JM. An unexpected outcome during testing of commercially available demineralized bone graft materials: how safe are the nonallograft components? *Spine (Phila Pa 1976)* 2001;26:1425-8.
- Brighton CT, Hunt RM. Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. *J Bone Joint Surg Am* 1991;73:832-47.
- Huss WJ, Hanrahan CF, Barrios RJ, Simons JW, Greenberg NM. Angiogenesis and prostate cancer: identification of a molecular progression switch. *Cancer Res* 2001;61:2736-43.
- Vecchi A, Garlanda C, Lampugnani MG, Resnati M, Matteucci C, Stoppacciaro A, et al. Monoclonal antibodies specific for endothelial cells of mouse blood vessels. Their application in the identification of adult and embryonic endothelium. *Eur J Cell Biol* 1994;63:247-54.
- Vanzulli S, Gazzaniga S, Braidot MF, Vecchi A, Mantovani A, Wainstok de Calmanovici R. Detection of endothelial cells by MEC 13.3 monoclonal antibody in mice mammary tumors. *Biocell* 1997;21:39-46.
- DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, Burdick MD, Robinson CS, Wexler RS, et al. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol* 1997;151:671-7.
- Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 1998;(355 Suppl):7-21.

17. Szpalski M, Gunzburg R. Applications of calcium phosphate-based cancellous bone void fillers in trauma surgery. *Orthopedics* 2002;25(5 Suppl):601–9.
18. Kelly CM, Wilkins RM, Gitelis S, Hartjen C, Watson JT, Kim PT. The use of a surgical grade calcium sulfate as a bone graft substitute: results of a multicenter trial. *Clin Orthop Relat Res* 200;382:42–50.
19. Webb J CJ, Tricker J. A review of fracture healing. *Current Orthopaedics* 2000;14:457–63.
20. Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN. Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83-A Suppl 2 Pt 2:98–103.
21. Buttermann GR, Glazer PA, Bradford DS. The use of bone allografts in the spine. *Clin Orthop Relat Res* 1996;324:75–85.
22. Kerimoğlu S, Livaoglu M, Sönmez B, Yuluğ E, Aynaci O, Topbas M, et al. Effects of human amniotic fluid on fracture healing in rat tibia. *J Surg Res* 2009;152:281–7.
23. Hannouche D, Petite H, Sedel L. Current trends in the enhancement of fracture healing. *J Bone Joint Surg Br* 2001;83:157–64.
24. Einhorn TA. Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am* 1995;77:940–56.
25. Adams JG Jr, Dhar A, Shukla SD, Silver D. Effect of pentoxifylline on tissue injury and platelet-activating factor production during ischemia-reperfusion injury. *J Vasc Surg* 1995;21:742–9.
26. Hoie EB, McGuire TR, Leuschen PM, Zach TL. Pentoxifylline inhibits tumor necrosis factor- α induced synthesis of complement component C3 in human endothelial cells. *Biol Pharm Bull* 2004;27:1670–3.
27. Bombini G, Canetti C, Rocha FA, Cunha FQ. Tumour necrosis factor- α mediates neutrophil migration to the knee synovial cavity during immune inflammation. *Eur J Pharmacol* 2004;496:197–204.
28. Feng D, Nagy JA, Pyne K, Dvorak HF, Dvorak AM. Ultrastructural localization of platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1, CD31) in vascular endothelium. *J Histochem Cytochem* 2004;52:87–101.
29. Luu NT, Rainger GE, Buckley CD, Nash GB. CD31 regulates direction and rate of neutrophil migration over and under endothelial cells. *J Vasc Res* 2003;40:467–79.
30. Kiyoshima T, Fukuda S, Matsumoto M, Iida Y, Oka S, Nakakimura K, et al. Lack of evidence for apoptosis as a cause of delayed onset paraplegia after spinal cord ischemia in rabbits. *Anesth Analg* 2003;96:839–46.
31. Mackey ME, Wu Y, Hu R, DeMaro JA, Jacquin MF, Kanellopoulos GK, et al. Cell death suggestive of apoptosis after spinal cord ischemia in rabbits. *Stroke* 1997;28:2012–7.
32. Oz Oyar E, Korkmaz A, Kardesş O, Omeroğlu S. Aortic cross-clamping-induced spinal cord oxidative stress in rabbits: the role of a novel antioxidant adrenomedullin. *J Surg Res* 2008;147:143–7.
33. Delanian S, Chatel C, Porcher R, Depondt J, Lefaix JL. Complete restoration of refractory mandibular osteoradionecrosis by prolonged treatment with a pentoxifylline-tocopherol-clodronate combination (PENTOCLO): a phase II trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011;80:832–9.
34. Ahlström M, Lamberg-Allardt C. Rapid protein kinase A-mediated activation of cyclic AMP-phosphodiesterase by parathyroid hormone in UMR-106 osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 1997;12:172–8.
35. Kimmel DB, Bozzato RP, Kronis KA, Coble T, Sindrey D, Kwong P, et al. The effect of recombinant human (1–84) or synthetic human (1–34) parathyroid hormone on the skeleton of adult osteopenic ovariectomized rats. *Endocrinology* 1993;132:1577–84.
36. Shen V, Dempster DW, Birchman R, Xu R, Lindsay R. Loss of cancellous bone mass and connectivity in ovariectomized rats can be restored by combined treatment with parathyroid hormone and estradiol. *J Clin Invest* 1993;91:2479–87.
37. Kurtoglu S, Gunes T, Koklu E, Bastug O, Canoz O, Kula M, et al. Influence of maternal nicotine exposure on neonatal rat bone: protective effect of pentoxifylline. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007;232:398–405.
38. Kinoshita T, Kobayashi S, Ebara S, Yoshimura Y, Horiuchi H, Tsutsumimoto T, et al. Phosphodiesterase inhibitors, pentoxifylline and rolipram, increase bone mass mainly by promoting bone formation in normal mice. *Bone* 2000;27:811–7.
39. Horiuchi H, Saito N, Kinoshita T, Wakabayashi S, Tsutsumimoto T, Takaoka K. Enhancement of bone morphogenetic protein-2-induced new bone formation in mice by the phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline. *Bone* 2001;28:290–4.
40. Shimizu K, Yoshikawa H, Matsui M, Masuhara K, Takaoka K. Periosteal and intratumorous bone formation in athymic nude mice by Chinese hamster ovary tumors expressing murine bone morphogenetic protein-4. *Clin Orthop Relat Res* 1994;300:274–80.
41. Lee YS, Chuong CM. Activation of protein kinase A is a pivotal step involved in both BMP-2- and cyclic AMP-induced chondrogenesis. *J Cell Physiol* 1997;170:153–65.
42. Aydin K, Sahin V, Gürsu S, Mercan AS, Demir B, Yildirim T. Effect of pentoxifylline on fracture healing: an experimental study. *Ekleml Hastalik Cerrahisi* 2011;22:160–5.