



**T.C.**  
**ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DİSTRAKSİYON OSTEOGENEZİSİNDE HIF 1-ALFA STABİLİZATÖRÜ**  
**KULLANIMININ ETKİSİ**

**Dr. Ahmet ÖZDEL**

**UZMANLIK TEZİ**

**BURSA-2012**



**T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DİSTRAKSİYON OSTEOGENEZİSİNDE HIF 1-ALFA STABİLİZATÖRÜ  
KULLANIMININ ETKİSİ**

**Dr. Ahmet ÖZDEL**

**UZMANLIK TEZİ**

**Danışman: Prof. Dr. Bartu SARISÖZEN**

**BURSA-2012**

## İÇİNDEKİLER

Özet	ii
İngilizce Özet	vi
Giriş	1
I. Ekstremitte Uzatılması ve Distraksiyon Osteogenezisi	2
II. Distraksiyon Osteogenezisi ve Anjiogenezis	3
III. HIF-1'in Stabilizasyonu ve VEBF	5
IV. FG-2216	9
Gereç ve Yöntem	11
I. Cerrahi Teknik	11
II. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Değerlendirme	14
III. İstatiksel Değerlendirme	15
Bulgular	16
Tartışma ve Sonuç	24
Kaynaklar	29
Teşekkür	35
Özgeçmiş	36

## ÖZET

Çalışmada sıçanlar üzerinde oluşturulan hızlı distraksiyon osteogenezisi modelinde oral yolla verilen HIF stabilizatörünün (FG-2216) kemik oluşumu üzerine etkisi incelenmiştir. Bunun için 12'şer sıçandan oluşan deney ve kontrol grupları planlandı. Tüm sıçanların sol tibia diafizine genel anestezi altında osteotomi uygulanarak mini eksternal fiksator ile tespit edildi ve günde 2 x 0.4mm distraksiyon 10 gün süreyle uygulandı. Deney grubuna deney boyunca bir prolil hidroksilaz inhibitörü olan ve anjiogenezisi stimüle eden FG-2216 oral yolla verildi. Onaltıncı ve 30. günlerde tibiadaki distraksiyon aralığından elde edilen rejeneratta, histolojik olarak yeni kemik oluşumu ve immünohistokimyasal olarak doku vasküler endotelial büyüme faktörü aktivitesi değerlendirildi.

Yeni kemik oluşumu her iki grupta da gerek erken, gerek ise geç dönemde yetersiz olarak saptandı. Deneyin 16. gününde yapılan değerlendirmede erken kemikleşme bulguları açısından deney grubundaki sıçanlarda nispeten daha yüksek oranlar elde edilmiş olmasına karşın, konsolidasyon dönemi sonrası 30. günde her iki grup arasında belirgin bir fark gözlenmedi. VEBF aktivitesi gerek erken gerekse geç dönemde deney grubunda daha yüksekti. Ortalama VEBF skorları 16. günde deney grubunda 1.67, kontrol grubunda 0.5 ( $p<0.05$ ) ; 30. günde deney grubunda 0.7, kontrol grubunda 0.3 olarak saptandı.

HIF1- $\alpha$  stabilizasyonu ve VEBF etkinliğinin artırılması distraksiyon osteogenezisinde yeni kemik oluşumunu destekleyen bir etken olarak deneysel ve klinik kullanım alanı bulma potansiyeline sahiptir. Bu çalışmada prolil hidroksilaz inhibisyonu yaparak HIF1- $\alpha$  yolu üzerinde stabilizatör etkisi gösteren ve bu yolla VEBF düzeyini arttıran FG-2216 maddesinin etkinliği gösterildi. FG-2216 verilmesi, hızlı distraksiyona rağmen VEBF etkinliğinin deney süresince aktif olarak kalmasını sağladı. Yalnız VEBF aşamasının uyarılması ise deneyde kullanılan hızlı uzatmanın yarattığı olumsuz biyomekanik ortamın etkilerini dengeleyemediğinden yeni kemik oluşumu

yetersizdi. Oral ajan kullanımı ile distraksiyon osteogenezisinde VEBF etkinliğinin arttırılması ekstremite uzatma cerrahisinin klinik uygulamalarında gelecek için umut vaad etmektedir. Bu amaca yönelik olarak deneysel distraksiyon osteogenezisi modellerinde anjiogenezis uyarımının ve farklı biyomekanik koşulların etkileşimini inceleyen yeni çalışmalara gereksinim vardır.

**Anahtar kelimeler:** Anjiogenezis, VEBF, distraksiyon osteogenezisi, FG-2216.

## SUMMARY

### The Effect of HIF 1-alpha Stabilizer on Distraction Osteogenesis

We investigated the effect of an orally usable HIF stabilizer (FG-2216) on bone formation in fast distraction osteogenesis model of rats. Experiment and control groups of 12 rats in each are planned. Under general anaesthesia osteotomies were performed on left tibia diaphysis of all rats. Tibiae were fixed by using an external fixator; distraction was performed with a rhythm of 2x0.4mm/day for 10 days. FG-2216 as a prolyl hydroxylase inhibitor and angiogenesis stimulator was orally administered to the experiment group during the whole experiment period. On day 16 and 30; samples of tibial regenerate were taken from the distraction gap and histological, immunohistochemical evaluation were made for new bone formation and vascular endothelial growth factor activity.

New bone formation were found to be adequate neither for the early nor for the late period in both groups. In spite of the relatively high rates of early ossification findings for the experiment group on day 16, no significant difference was observed between the groups on day 30 after the consolidation period. VEGF activity of the experiment group was more than the control in either early or late period. On day 16, the mean VEGF scores were estimated 1.67 for the experiment group and 0.5 for the control ( $p < 0.05$ ); on day 30, it was 0.7 for the experiment group and 0.3 for the control.

Stabilization of HIF1- $\alpha$  and enhancement of VEGF activity are considered as supporters for new bone formation in distraction osteogenesis and they can be used in clinical and experimental studies. The effect of FG-2216 as a stabilizer through HIF1- $\alpha$  pathway by inhibiting prolyl hydroxylase in order to increase the level of VEGF, was shown in this study. Despite the fast distraction rate, the active VEGF function was stored during the

experiment period by administering FG-2216. When only VEGF was stimulated, it could not balance the negative biochemical conditions created by fast distraction; and so we observed poor new bone formation. Stimulation of VEGF activity in distraction osteogenesis by using an oral agent is encouraging for clinical procedures of extremity lengthening surgery in the future. New studies are required for investigating these interactions between stimulation of angiogenesis and different biomechanical conditions in experimental distraction osteogenesis models.

**Key words:** Angiogenesis, VEGF, distraction osteogenesis, FG-2216.

## GİRİŞ

Kemik dokusu yüksek derecede onarım ve rejenerasyon özelliklerine sahip bir dokudur. İskelet gelişimi ve kırık iyileşmesi sırasında anjiogenezis ve kemik oluşumu eşzamanlı ilerlemektedir. Embriyogenezis, endometriyal rejenerasyon ve yara iyileşmesi gibi fizyolojik süreçlerdeki ya da kanser gibi patolojik koşullardaki anjiogenezisin düzenlenmesi ile ilgili elde edilen yeni bilgilerle anjiogenik faktörlerin kemik hücreleri ile olan, kemik oluşumunu ve rejenerasyonunu artırıcı etkileşimi daha iyi anlaşılmasına başlanmıştır. Uygun kemik rejenerasyonu ve kırık iyileşmesi için hipoksi ve anjiogenik faktörlerin meydana çıkmasının kritik olduğu gösterilmiştir (1,2). Bununla birlikte yeterli kemik homeostazisinin sağlanması için; osteoblastların, osteoklastların, endotel hücrelerinin, anjiogenik faktörlerin ve bunların etkileşimlerinin belirlenmesi ile kemik patolojilerinin tedavisinin planlanmasında vaskülaritenin önemi büyüktür.

Konjenital büyüme geriliği ve kemik defekti olan iskelet deformitelerinde distraksiyon osteogenezisi önemli bir tedavi yöntemidir. DO sırasında kemik rejenerasyonuna etki eden en önemli faktörler mevcut vasküler yapıların yeniden şekillenmesi (anjiogenezis) ve yeni vasküler yapıların oluşmasıdır (vaskülogenezis) (3,4). Anjiogenezis ve vaskülogenezis kompleks moleküler etkileşimler ile stimüle edilmektedir. Anjiogenezisteki rol alan en önemli yapılardan biri endotel hücreleridir. Anjiogenezis sırasında endotel hücreleri yer değiştirmekte, tübüler yapılar oluşturmakta ve sonunda kan akımına elverişli bir temas sağlamaktadır. Bu oluşumun organizasyonu için birçok moleküler etkileşim gerekmektedir. Bu moleküllere genel olarak "anjiogenik faktörler" adı verilmektedir. Bu mekanizmalardan farklı olarak hipoksi de diğer bir iyi bilinen anjiogenezisi tetikleyen faktördür ve hipoksi ile indüklenebilir faktör – 1 (HIF-1) adlı transkripsiyon faktörünün stabilizasyonu üzerinden etki göstererek VEBF(vasküler endotelial büyüme faktörü) ekspresyonunu uyarıcı etkisi bulunmaktadır. VEBF yeni kemik oluşumunda kan damarlarının invazyonuna önemli derecede aracılık etmektedir.



FG-2216, HIF stabilizatörü (Prolil hidroksilaz inhibitör,PHD) olarak HIF 1-  $\alpha$ 'nın yıkımını engelleyerek etkin formda kalmasını sağlamakta ve VEBF düzeylerini arttırıcı özellik göstermektedir. Schipani (5) HIF- $\alpha$  yolunun normal endokondral büyüme plağı gelişimi için gerekli olduğunu daha önce göstermiştir.

Çalışmamızda ritmi hızlandırılmış distraksiyon ile osteotomi hattında kemik rejenerasyonu ve angiogenezin FG-2216 uygulanması ile olan ilişkisi incelendi.

## **I. Ekstremitte Uzatılması ve Distraksiyon Osteogenezisi**

DO mekanik streslerin kompleks biyolojik sinyallere ve değişikliklere dönüştüğü ve yeni kemik dokusu oluşumu ile sonlanan aktif bir süreçtir. Uygulamada kemik osteotomi ile ayrılarak yeni kemik oluşumu cihaz ile kontrol edilir. İlk olarak Codivilla (6) tarafından uygulanmış; yıllar sonra ise İlizarov (7) tarafından DO ile ilişkili kemik rejenerasyonunun fizyolojik mekanizmalarının ortaya konulması ile ortopedik ve maksillofasyal cerrahide geniş kullanım alanlarına taşınmıştır. Günümüzde kemiklerde travma, enfeksiyon ya da tümör rezeksiyonu sonrasında meydana gelen segmental kayıp ve deformitelerin tedavisinde DO yaygın olarak kullanılmaktadır.

Distraksiyon osteogenezisi latent, distraksiyon ve konsolidasyon olarak üç ana fazdan oluşmaktadır: Latent dönem (osteotomiden hemen sonraki dönem), distraksiyon dönemi, ve konsolidasyon dönemi (distraksiyon durdurulduktan sonraki dönem) (8, 9). Bu tip kemik rejenerasyonu uygun kanlanmayla karakterizedir. Latent dönem travma ya da osteotomiye takiben hemen başlamakta ve aktif distraksiyona geçilene kadar devam etmektedir. Bu aşamadaki olaylar kırık iyileşmesinin erken dönemine benzerdir. Ancak aktif distraksiyon fazı başladığında primer inflamasyon mekanizmaları tamamlanmıştır. Distraksiyon fazında kallus üzerine belirli bir ritimde tensil kuvvetler uygulanmaktadır. Kallus gerildikçe santral bölgede fibröz interzon oluşmaya başlar. Bu bölge kondrositten, fibroblastlardan ve fibroblast ile kondrositler arasında bir morfolojiye sahip olan oval hücrelerden zengindir

(10-12). Fibröz interzonda farklılaşmış osteoblastlar kollajen demetleri boyunca osteoid olarak birikir. Daha sonra mineral kristalizasyonuna uğrayarak kollajen demetlerine paralel şekilde mikrokolon zonunu meydana getirirler. Fibröz interzon ve mikrokolon zonları arasında yüksek oranda gelişen hücrelerin olduğu primer matriks görülmeye başlar. Hedeflenmiş kemik uzunluğuna erişildiğinde distraksiyon durdurulur ve büyük miktarda osteoidin mineralizasyona uğradığı yeniden yapılanma fazı olan konsolidasyon evresine geçilir. Distraksiyon osteogenezisi sırasındaki kemik rejenerasyonunun iyileşme dönemindeki kallus üzerine uygulanan longitudinal gerginliğe bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu gerginliğin kemik oluşmasını sağladığı mekanizma tam olarak açıklanamamıştır. Canlı dokuların yavaş ve kararlı bir traksiyon uygulanırken metabolik olarak aktifleşmesi ile “mekanotransduksiyon” fenomeni meydana gelmekte ve durum proliferatif ve biyosentetik hücrel fonksiyonların uyarılması ile ilişkilendirilmektedir (13). Bu mekanik stres kemik yapımı için indüksiyon sağlamaktadır. Stres devam ettiği sürece yeni kemik oluşumu için sinyal üretimi de artarak etki göstermektedir.

DO sırasında birçok faktör rol oynamaktadır. Bunlar arasında osteotomi tipi, tespit stabilitesi, distraksiyon hızı ve zamanlaması uzatma sırasında kallus oluşumunda rol alan en önemli faktörlerdir. Ayrıca kemik rejenerasyonunda rol alan faktörler ve anjiogenik faktörler de mekanizmanın ayrılmaz parçalarıdır.

## **II. Distraksiyon Osteogenezisi ve Anjiogenezis**

İskelet iki farklı mekanizma ile oluşmaktadır: İntramembranöz kemikleşme ve endokondral kemikleşme. İntramembranöz kemikleşme kafatası ve yüz kemikleri gibi yassı kemiklerin gelişiminde etkilidir. Mezenşimal hücrelerin yeni kemik oluşturmak için doğrudan farklılaşmasıyla ve anjiogenezis ile pek de ilişkili görünmeyen bir mekanizma ile gerçekleşir (14). Endokondral kemikleşme embriyo gelişimi sırasında uzun kemiklerin oluşmasından sorumludur ve kallus yapısı ile sonuçlanan kırık iyileşmesinde

baskın mekanizmadır. DO'nin erken dönemlerinde endokondral kemikleşme görülse de ileriki dönemlerde baskın olan intramembranöz kemikleşmedir. Bu tip kemik oluşumunda avasküler kıkırdaktaki hipoksik alanlar, HIF stabilizasyonu ve VEBF üretimine olanak vererek anjiogenezisin uyarılmasını sağlarlar. Böylece kemik oluşumundan sorumlu hücrelerin belirmesini takiben damar ağ yapıları meydana gelir (15). İlk oluşan kıkırdağın çevresini saran periosteal kemik oluşmadan ve perikondrium vaskülarize olmadan embriyonik avasküler kıkırdakta damar invazyonu görülmez. Bu aşamada VEBF izoformlarının aşırı ekspresyonu farelerdeki avasküler kıkırdağa kan damarı sunumunu başaramamaktadır (16). Vaskülarize kemik örtü oluştuktan sonra perikondrium içerisindeki anti-anjiogenik özellikler kaybolur ve VEBF146, VEBF166 ve VEBF190 izoformlarının aşırı ekspresyonu ile kıkırdak yapısına damar invazyonu hızlanır (16). Ayrıca endokondral kemikleşmede önemli etkiye sahip olan MMP (Matriks metalloproteinaz) -9 ve MMP-13 de kıkırdak dokuya damar invazyonunun sağlanmasına yardımcı olmaktadır (17). Matriks metalloproteinazlar ayrıca ekstrasellüler matriksten VEBF salınımına yol açmaktadırlar (18). Bu aşamada kan damarları kondrositleri, besin içeren kemik hücrelerini ve mezenşimal hücreleri temin etmektedir (19,20). Aslında hipoksinin kondrositlerin normal gelişimi ve büyüme plağının düzenli yapılması için gerekli olduğu gösterilmiştir (5). Kemik oluşumunun en üst seviyede olduğu pubertede serum kemik oluşum belirteçleri ile uyumlu olarak çok miktarda ve osteoblast ailesinden olan hücrelerin insanlarda varlığı gösterilmiştir (21).

Moleküler ve hücre biyolojideki gelişmelerle birlikte araştırmacılar kemik gelişimi ve anjiogenezis arasındaki ilişkiyi daha iyi anlamaya başlamışlardır. Wang ve ark.(14) çalışmalarında farelerde genetik manipulasyonla HIF-1 miktarını arttırarak kemik dokusunda ve damarlanmada artışa yol açmıştır. Aynı araştırmacılar osteoblastlarında HIF-1'den yoksun olarak hazırlanan farelerin uzun kemiklerinin daha ince yapıda ve damarlanmalarının daha az miktarda olduğunu göstermişlerdir (14). Endokondral kemikleşmede anjiogenezisin önemine bağlı olarak HIF-1'den yoksun farelerde sadece sonraki kemik oluşum mekanizmalarında bozulma

tespit edilmiş; klavikula gibi intramembranöz kemikleşme olan bölgelerde mezenşimal hücre yoğunlaşması ise değişmemiştir (14). Hipoksi ayrıca in vitro olarak primer sıçan osteoblastlarının farklılaşmasını inhibe etmekte ve apoptozis olmaksızın sessiz bir ortam yaratmaktadır (22). Bu da kemik homeostazisi yeniden sağlanana kadar osteoblastların canlılığını koruyan bir mekanizma olarak düşünülmektedir.

Anjiogenezisin kemik rejenerasyonu ve kırık iyileşmesi ile olan ilişkisinin kanıtları giderek artmaktadır (23-25). Ancak osteogenezis ve anjiogenezisin eş zamanlı rol oynadığı mekanizmalar tam olarak anlaşılammıştır. DO sırasında VEBF, anjiopoetin-1 ve 2, basit fibroblast büyüme faktörü gibi anjiogenik moleküllerin aşırı eksprese olduğu gösterilmiştir (26). VEBFR-1 ve VEBFR-2'ye karşı olan antikorların kullanımı ile DO engellenmektedir (27). Sıçanda yapılan bir DO modelinde TNP-470 adlı genel anjiogenezis inhibitörünün (sentetik bir fumagilin analogu) kemik rejenerasyonunu engellediği gösterilmiştir (28). Diğer yandan başka bir çalışmada distraksiyon boşluğuna uygulanan DFO'in hipoksik ortam oluşturarak osteoblastların ve anjiogenezisin artışıyla kemik rejenerasyonunu hızlandırdığı belirtilmiştir (29). Buna göre VEBF'ün VEBFR-1 ve VEBFR-2 antikorlarının enjeksiyonu ile inaktivasyonu ya da genetik manipulasyon ile HIF-1 aktivitesinin bozulması farelerde kemik rejenerasyonunda yetersizlik ile sonuçlanmıştır (29). Endokondral kemikleşme tipi olan kırık iyileşmesi de VEBF'e bağlı olarak meydana gelmekte ve VEBF aktivitesinin inhibisyonu kallus oluşumu ve onarımda aksamaya yol açmaktadır (30,31). Bu düşünce doğrultusunda distraksiyon osteogenezisinde VEBF'ün daha baskın olarak rol oynadığı dönemin kallus oluşumunun başladığı latent ve distraksiyon dönemleri olduğu görülmektedir. Kırığı olan ve VEBF üretimi azalan hastalarda prognozun kötü olması da bunu desteklemektedir (32).

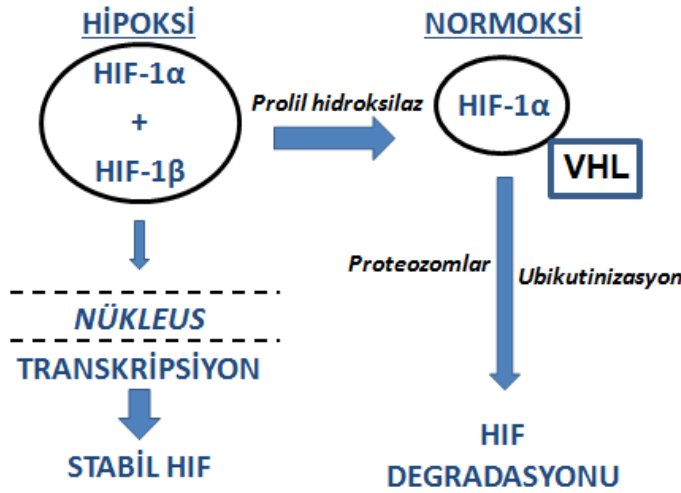
### **III. HIF- 1'in Stabilizasyonu ve VEBF**

Üç tip HIF tanımlanmıştır: HIF-1, HIF-2, HIF-3 (33). HIF-3 diğer iki tip ile ilişkili değildir ve anjiogenezisteki rolü bilinmemektedir (34). HIF-2 de

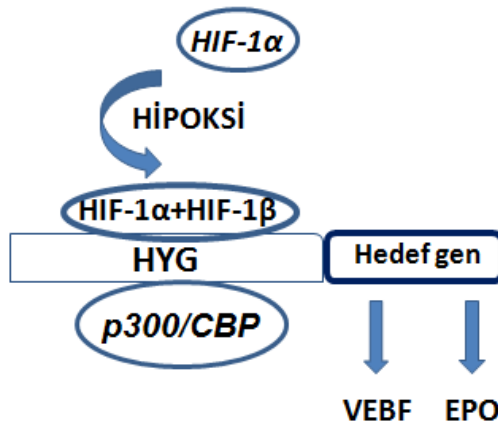
hipoksik koşullarda fonksiyon göstermekte ve HIF-1 ile benzerlik taşıyan özelliklere sahiptir (14). HIF-1, Per/Arnt/Sim (PAS) protein ailesine ait Arnt (Ariil hidrokarbon reseptör translokator) olarak da adlandırılan iki basit helikal kıvrımlı protein olan HIF-1  $\alpha$  ve HIF-1  $\beta$  'dan oluşan bir heterodimerdir(35). HIF-1 etki gösterebilmesi için p300 ve CREB (cAMP'ye yanıt veren elemanın bağlandığı transkripsiyon faktörü) bağlayıcı proteine (CBP) ihtiyacı bulunmaktadır (36). HIF-1 protein stabilizasyonu ve aktivitesi oksijen düzeyleri ile düzenlenmektedir. HIF-1 için iki tip oksijen sensörü bulunmaktadır: 1)Oksijen bağımlı degradasyon alanındaki iki reziduda hidroksilasyon yapan proliil hidroksilaz alan protein (PHD) (37) ve 2) HIF-1'e asparajin rezidusunda hidroksilasyon yapan asparajin hidroksilaz (HIF-1'i inhibe eden faktör, FIH) (38). Bu iki enzim ortamdaki oksijen basıncı normal iken aktive olur. PHD aktivasyonu, von Hippel-Lindau (VHL) proteini adlı bir E3 ligazının etkisiyle HIF-1 ubiquitinizasyonu ve degradasyonuna yol açar (39). Böylece HIF inaktif durumda kalır. FIH tarafından hidroksilasyon ise HIF-1 ile p300 ve CBP arasındaki etkileşimi bozarak HIF-1 fonksiyonunda azalmaya neden olur. Hücreler hipoksiyi algıladıktan sonra HIF-1 $\alpha$  stabilize olarak HIF-1 $\beta$ 'ya bağlanır ve HIF-1 yapısı meydana gelir. HIF-1 nukleusa transloke olur ve hipoksiden sorumlu sekansa, 5'-RCGTG-3'(R:Purin rezidusu) bağlanarak gen transkripsiyonu ile fonksiyon gösterir(40). Sonuçta hipoksik ortam HIF'ün stabilize olmasını sağlayarak anjiogenezis için gerekli gen bölgesini aktifleştirir.

Günümüzde HIF-1 tarafından düzenlenen anjiogenezis, apoptozis, glukoz transportu gibi metabolik fonksiyonlarla ilişkili 100'den fazla gen bildirilmiştir(41-43). Bunların içerisinde en önemlisi VEBF-A genidir(44, 45). Hipoksi uzun kemiklerin epifizlerinde görülmektedir; kondrosit farklılaşmasında(46), kemiğin yeniden şekillenmesinde ve kırık sonrası kemik iyileşmesinde önemli rol oynamaktadır. VEBF-A genellikle sadece VEBF olarak bilinmektedir ve ilk olarak hücre geçirgenliğini artırıcı özelliği ile nedeniyle vasküler permeabilite faktör (VPF) olarak tanımlanmıştır(47). VEBF'ün anjiogenik özellikleri farklı zamanlarda bağımsız olarak keşfedilmiştir (48) ve VEBF ve VPF'ün aslında aynı molekül olduğu anlaşılmıştır (49).

VEBF plasental büyüme faktörü, VEBF-B, VEBF-C ve VEBF-D ile aynı ailede yer almaktadır. Farelerde ve insanlarda VEBF120, VEBF 164, ve VEBF188 başta olmak üzere farklı VEBF tipleri de tespit edilmiştir (50, 46).



**Şekil-1:** HIF stabilizasyonu. Oksijen varlığında HIF-1α prolyl hidroksilaz tarafından hidroksillenerek von Hippel Lindau proteinine (VHL) bağlanır ve HIF-1α poliubikutinizasyona uğrayarak degrade olur. Hipoksik koşullarda HIF-1α'nın prolyl hidroksilaz ile hidroksilasyonu engellenir ve stabilize olur. Nükleusa geçerek hipoksiye yanıt veren sorumlu gen bölgelerini (HYG) uyarır.



**Şekil-2:** Hipoksik koşullarda nükleusta HIF-1α, p300/CBP kofaktörleri ile etkileşerek hipoksiye yanıt veren sorumlu gen bölgesini (HYG) uyarır. Transkripsiyon sonrası VEBF ve eritropoetin (EPO) uyarılır.

VEBFR ekspresyonu hipoksik koşullarda düzenlenmektedir (51). Reseptörü alternatif bölünme ile sonuçlanan çözünebilir formda olup VEBF etkisini inhibe etmektedir (52). VEBFR-2, VEBF bağlanmasını sağlayan sinyal transdüksiyonu ile ilgili ana mediatördür. Birçok tirozin ile reseptör dimerizasyonu ve otofosforilasyonu sağlamaktadır (53). Bu otofosforilasyon endotel hücrelerinde fosfolipaz C- $\gamma$ , RAS GTPaz, SCR kinaz ve ekstrasellüler sinyal ile regüle edilen kinazların aktive olmasını sağlayan birçok moleküler mekanizmayı tetikler ve endotel hücrelerinin migrasyonunu, proliferasyonunu ve farklılaşmasını uyarır (54).

VEBF'ün kemik gelişimindeki rolü geniş ve karmaşıktır. İlk oluşan kırıkdağı saran periosteal yapı oluşmadan, yani perikondrium vaskülarize olmadan embriyonik avasküler kırıkdağa kan damarlarının invazyonu gerçekleşmez. Gelişmekte olan iskelette yoğunlaşan mezenşimal doku VEBF sinyali üzerinden kırık dokusu içerisine damar invazyonunu düzenlemektedir (55).

VEBF'ün endotel hücreleri üzerindeki etkisinin yanında kemik hücrelerinde osteoblast ve osteoklastları etkileyen özellikleri bulunmaktadır. Bu her iki hücre grubunda VEBF ve reseptörlerinin ekspresyonunun mümkün olduğu gösterilmiştir (56). VEBF osteoblast farklılaşmasını etkilemektedir. Trabeküler kemikten kaynaklanan mezenşimal hücreler farklılaşmaları sırasında VEBF ve VEBF-R-1 eksprese etmektedirler (57). Bir çalışmada hipoksinin VEBF ekspresyonunu arttırdığı ama diğer bir anjiyojenik faktör olan basit fibroblast büyüme faktörünü (bFGF) arttırmadığı gösterilmiştir. Bu bulgular kırık iyileşmesinde VEBF'ü potansiyel bir tedavi ajanı olarak göstermiştir.

Kemotaksis doku oluşumu ve yara iyileşmesinde kritik role sahiptir. VEBF'ün endotel hücreleri için önemli ve karmaşık etkili bir kemoatraktan olduğu kanıtlanmıştır (58, 59). Ek olarak VEBF 165 gibi birçok anjiyojenik faktörün osteoblast hücre migrasyonunu invitro olarak sağladığını bunun kemik yeniden şekillenmesinde ve kemik kırık bölgelerinde in vivo olarak da mümkün olabileceği gösterilmiştir (60). VEBF ayrıca kemik dokusunda

kondrositlere kondroprojenitör farklılaşmayı sağlamaktadır. Kondrositler avasküler kemik alanlarında mezenşimal kondroprojenitör hücrelerden köken alırlar (61). Sadece VEBF 188 izoformunun eksprese edildiği bir fare modelinde kondrosit fonksiyon yetersizliği nedeniyle uzun kemiklerin gelişiminin uygun düzeyde olmadığı görülmüştür (62). Ancak bu VEBF izoformunun delesyonunda farelerde uygun damarlanmanın oluşmaması nedeniyle metafiz ve sekonder ossifikasyon merkezlerinde uyumsuzluk, eklem displazisi ve gelişme geriliği tespit edilmiştir (63). Ek olarak hem VEBF 164 hem de VEBF188'in olmadığı farelerde kemikle ilişkili genler ile kondrosit farklılaşmasının ekspresyonunda azalmaya bağlı olarak damarlanmada, kemik gelişiminde ve trabeküler yapılanmada yetersizlik meydana gelmektedir (62). Başka bir çalışmada sadece VEBF 120 izoformunu eksprese eden farelerde perikondriumun damarlanmasında gecikme ve embriyoda primer ossifikasyonda aksama meydana gelmektedir (64). Farelerde spesifik kondrosit VEBF delesyonu sonucu endokondral ossifikasyonun olduğu eklem bölgelerindeki ve epifizlerdeki kondrositlerin yaşam süresinde kısalma ve damarlanmada gecikme saptanmıştır (65).

## VI. FG-2216

Butyl 10-undecenoate; formülü  $C_{15}H_{28}O_2$ , molekül ağırlığı 240,38 g/mol'dür. Prolil hidroksilaz inhibitörü olarak fonksiyon göstererek HIF'ün stabilizasyonunu sağlayabilmektedir. Sonuç olarak daha önceki bölümlerde açıklanan HIF'e bağımlı gelişen birtakım mekanizmalar ile VEBF ekspresyonunda artış meydana getirmektedir. Yeni kemik oluşumunda avasküler kıkırdaktaki hipoksik alanlar HIF stabilizasyonu ve VEBF üretimine olanak vererek anjiogenezisin uyarılmasını sağlarlar. Böylece kemik oluşumundan sorumlu hücrelerin belirmesini takiben damar ağ yapıları meydana gelmektedir (15).

FG 2216 daha önce anemi tedavisinde uygulama alanı bulmuştur. Bernhardt ve ark. (66) yaptıkları çalışmada oral olarak aktif FG-2216 verilen kronik renal yetmezlikli hastalarda plazma eritropoetin düzeylerinde 30,8 ve



sağlıklı gönüllülerde ise 12,7 kat artış olduğu tespit edilmiştir. Bir başka çalışmada FG-2216 ile elde edilen spesifik proli-4 hidroksilaz inhibisyonunun miyokardiumdaki HIF düzeylerini arttırdığı ve infarktüs sonrasında miyokardium fonksiyonunun korunmasında yeni bir tedavi yaklaşımı olabileceği belirtilmiştir (67).

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 28.02.2012 tarih ve 2012-03/02 numaralı etik kurul kararı ile onaylanmıştır. Bu çalışmada yapılan histolojik ve immünohistokimyasal incelemeler Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilimdalı 11 laboratuvarlarında, istatistiksel ölçümler Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

Deneyde, Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme, Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen, ağırlıkları 250-400gr. arasında değişen 24 erişkin Wistar albino sıçan kullanıldı. Sıçanlar, her birinde 12 adet olmak üzere rastgele deney ve kontrol gruplarına ayrıldı. Gruplardaki sıçanların sol tibia diyafizlerine osteotomi yapılarak mini eksternal fiksator uygulandı. Her iki gruptaki sıçanlara 5 günlük latent dönemi takiben 10 gün boyunca 2x0,4mm/gün distraksiyon yapıldı. Deney grubundaki sıçanlara deney süresince (30 gün) oral yoldan 60 mg/kg/gün dozunda Butyl 10-undecenoate (FG-2216®, Sigma-Aldrich) verildi. Deneyin 16. gününde uzatma sonlandırıldı. Onaltıncı ve 30. günlerde gruplardan 6'şar sıçan sakrifiye edilerek tibiadaki distraksiyon hattı histolojik ve immünohistokimyasal olarak incelendi.

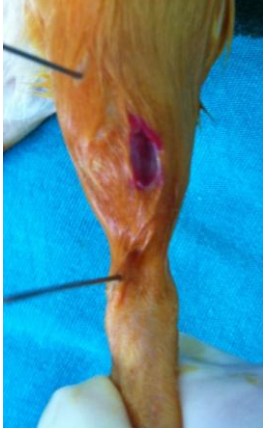
### I. Cerrahi Teknik

Anestezi amacıyla %2'lik ksilazin hidroklorür (Rompun®; Bayer Healthcare) 12 mg/kg ve ketamin hidroklorür (Ketalar®; Pfizer) 80mg/kg dozda farklı şiringalardan kas içi uygulandı. Sol alt ekstremitte ameliyat sahası %10 povidin iyod (Batticon®; Adeka) solüsyonu kullanılarak temizlendi ve steril olarak örtüldü. Sol tibia proksimal ve distal metafizlerine 0.8mm çapında birer adet pin perkütan olarak yerleştirildi. Tibia orta diyafizine longitudinal cilt kesisi ile ulaşılarak osteotom ile transvers osteotomi yapıldı. Serum fizyolojik ile osteotomi hattı yıkandı, cilt 4/0

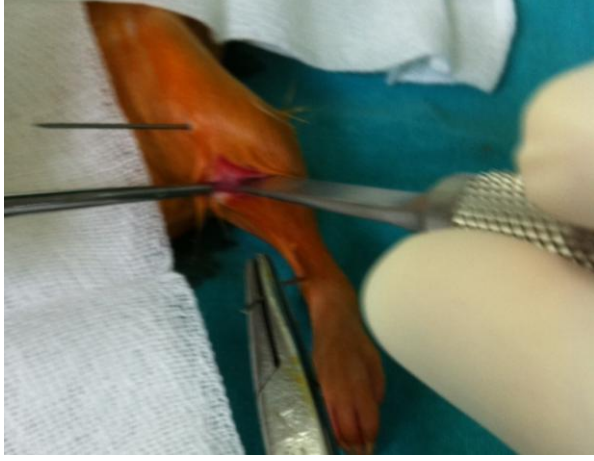
emilmeyen naylon monofilaman iplik ile (Ethilon™ Nylon Suture) kapatıldı. Proksimal ve distaldeki pinler ilizarat fiksatorüne tespit edildi. Cerrahi sonrasında bağımsız kafes aktivitesine bırakılan sıçanların, analjezi amacıyla 100 ml'lik içme sularına 1-2 mg/kg/gün dozunda parasetamol konuldu. Hayvanlar standart yem ile beslendiler, pin ve kesi bölgelerine günlük pansuman yapıldı.



**Şekil-3:** Tibia distal ve proksimal metafizlerine pin uygulanması.



**Şekil-4:** Cilt kesisi.



**Şekil-5:** Tibiaya osteotomi uygulanması.



**Şekil-6:** Eksternal fiksator uygulandıktan sonra ekstremitenin görünümü.



**Şekil-7:** Uzatmanın 10.gününde ekstremitenin görünümü.

## **II. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Değerlendirme**

Histopatolojik inceleme için her iki gruba ait distraksiyon bölgesini içeren örneklerin %10'luk formaldehit solüsyonunda fiksasyonu sağlandı. Takiben %10'luk formik asit solüsyonu içinde dekalsifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Örnekler dehidrasyonu takiben parafin bloklara gömüldü. Rutin takip işlemleri sonrası 4 µm lik kesitler alınarak hematoksilin-eosin (HE) ile boyanıp endokondral ve intramembranöz kemikleşmenin varlığı, iyileşme bölgesindeki damarlanmanın durumu ve yeni oluşan kemik trabeküllerinin özellikleri incelendi. Distraksiyon alanında, bol miktarda ve iyi gelişmiş, çevresinde aktif osteoblastik zincir bulunan, birbirleriyle anastomozlaşarak bir kemik ağı oluşturan, genelde osteotomi hattına uzunlamasına yönlenecek immatür kemik trabeküllerinin varlığı ossifikasyonun iyi olduğu yönünde değerlendirildi. Bu görünümün aksine sayıca az, düzensiz ve gelişigüzel yerleşmiş kemik trabeküllerinin izlendiği olgularda intramembranöz ossifikasyon yetersiz olarak değerlendirildi. Trabeküler yeni kemik oluşumu izlenen sahalarda, olgun hyalen kıkırdak adaları ve beraberinde hipertrofik kondrositlerin gözlenmesi ise endokondral ossifikasyonun varlığı şeklinde değerlendirildi.

Angiogenezi değerlendirmek için immünohistokimyasal boyama tekniği ile örneklere VEBF boyaması uygulandı. Bu amaçla kesitler 55 °C’de bir gece bekletildi. Etüvde parafini erimiş kesitler, soğumadan hızlıca ksilene alınarak 15 dakika bekletildi. Takiben 1:1 oranında ksilen ve %100’lük alkol karışımında 3 dakika inkübe edildi. Kesitler EDTA solüsyonu ile 20 dakika boyunca mikrodalgada muamele edildi. Mikrodalgadan çıkarılan kesitler, bu sıcak tampon içinde 20 dakika oda sıcaklığında soğumaları için bekletildiler. Lamdaki doku üzerine VEBF antikoru (VEGF antibody, Gene Tex®) damlatıldı, 1 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra lamlar akarsuda yıkanıp 10 dakika PBS solüsyonunda bekletildi. Süre sonunda biotin solüsyonu uygulandı. 15 dakika akarsuda yıkanıp 10 dakika PBS’de bekletildikten sonra 15 dakika streptavidin solüsyonu uygulandı. Yıkamadan sonra PBS’de bekletildi. DAB boyama yapılarak lamlar kurutuldu ve kapatılarak mikroskopik inceleme için hazır hale getirildi. İmmünohistokimyasal değerlendirme semikantitatif olarak yapıldı. Her iki grubun distraksiyon alanındaki fibroblast benzeri hücreler, osteoblastlar ve immatür osteositlerdeki boyanma dikkate alındı. Hiçbir hücrede boyanma yoksa 0, %1-25 oranındaki hücrede pozitif boyanma varsa 1, %26-50 oranındaki hücrede pozitif boyanma varsa 2, %50’nin üzerindeki hücrede pozitif boyanma varsa 3 olarak skorlandı (68).

### **III. İstatistiksel Değerlendirme**

İstatistiksel analizler SPSS 20.0 (IBM®) paket programında yapıldı. Kategorik değişkenler “n” ve “%” olarak ifade edildi. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında Pearson ki-kare ve Fisher’in kesin ki-kare testleri kullanıldı.  $P < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

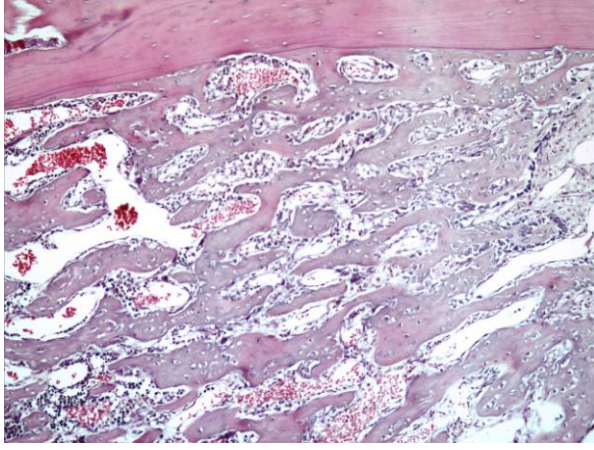
## BULGULAR

Verilen oral HIF stabilizatörüne karşı deneklerde herhangi bir yan etki gözlemlenmedi. Pin bölgesi enfeksiyonu tespit edilen deney grubundaki iki sıçan günlük yara bakımı ile takip edildi.

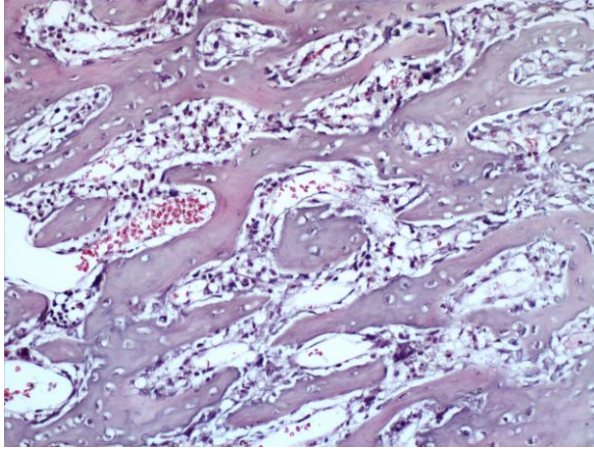
HE ile yapılan incelemelerde intramembranöz ve endokondral yeni kemik oluşumu genel olarak her iki grupta da yetersizdi. Uzatmanın sonlandırılmasından sonra 14 gün süreyle konsolidasyon gelişimi beklenen sıçanların, 30. günde yapılan histolojik incelemelerinde gözlenen kemikleşme düzeyi ile 16. günde değerlendirilen sıçanlarda gözlenen kemikleşme arasında nitelik ve oran olarak bir farklılık gözlenmedi. Distraksiyon alanının tümünü dolduran olgun trabeküler kemik yapısı gelişimi ve organizasyonu sıçanların hiç birinde gözlenmedi. Bu açıdan gruplar arasında istatistiksel bir farklılık da saptanmadı.

Intramembranöz ossifikasyon 16.günde deney grubunda 5 (%83), kontrol grubunda 3 (%50) sıçanda; 30. günde deney grubunda 4 (%67), kontrol grubunda ise 3 (%50) sıçanda belirlendi ( $p>0.05$ ). Kontrol grubunda 30. günde bir olguda psödoartroz gelişimi dikkati çekti. Endokondral ossifikasyon 16. günde deney grubunda 2 (%33), kontrol grubunda 1 (%16) sıçanda; 30. günde deney grubunda 2 (%33) ve kontrol grubunda 3 (%50) sıçanda tespit edildi ( $p>0.05$ ).

Ortalama VEBF skoru 16. günde deney grubunda 1.67, kontrol grubunda 0.5 olarak ölçüldü. Deneyin 30. gününde deney grubunun ortalama skoru 0.7, kontrol grubunun 0.3 olarak belirlendi. Gerek 16. gün, gerek 30. gün ölçümlerinde deney grubunun ortalama VEBF skoru kontrol grubuna göre daha yüksek olarak bulunmasına karşın, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark 16. gün değerlerinin ( $p<0.05$ ) karşılaştırılmasında gözlemlendi.

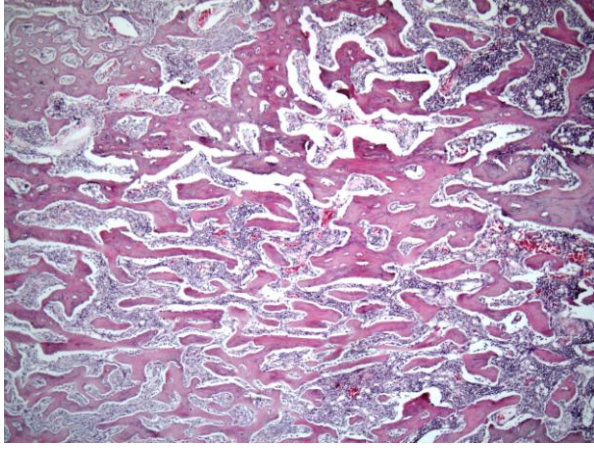


**Şekil-8:** Deney grubu, 16. gün, distraksiyon alanında düzenli kırık iyileşmesi. Birbirine paralel dizilmiş, yer yer birbirleriyle anastomozlaşan immatür kemik trabekülleri (HEX10).

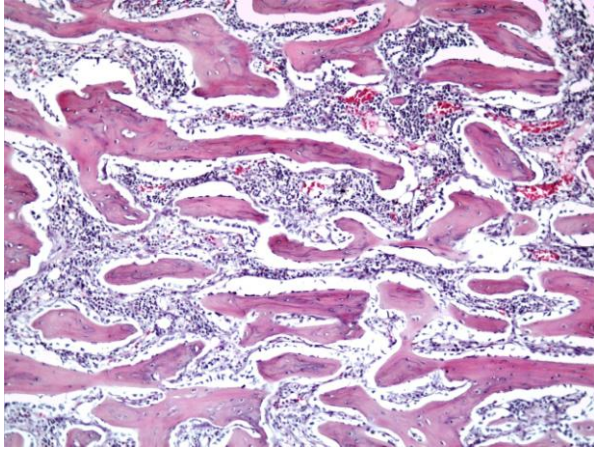


**Şekil-9:** Deney grubu, 16. gün, distraksiyon alanında düzenli kırık iyileşmesi. Çevrelerinde osteoblastik zincirin izlendiği immatür kemik trabekülleri (HEX20).

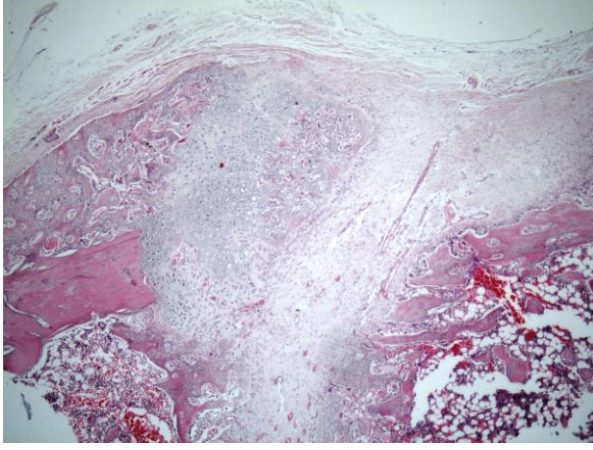




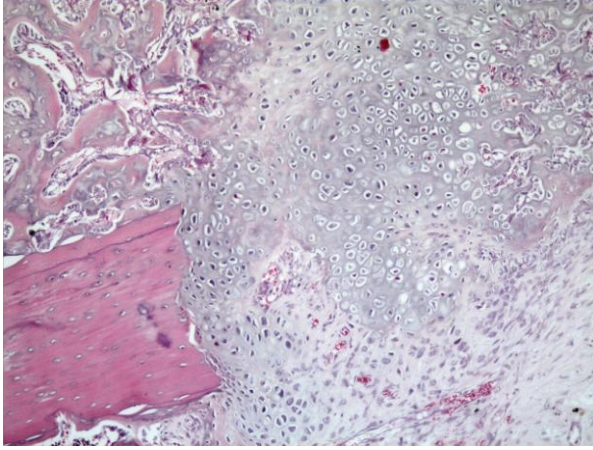
**Şekil-10:** Kontrol grubu, 16. gün, distraksiyon alanında orta derecede düzenli kırık iyileşmesi. Nisbeten düzenli dizilmiş immatür kemik trabekülleri (HEX10).



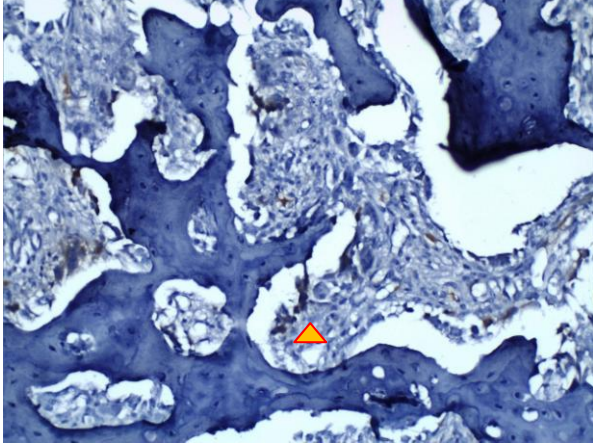
**Şekil-11:** Kontrol grubu, 16. gün, distraksiyon alanında orta derecede düzenli kırık iyileşmesi (HEX20).



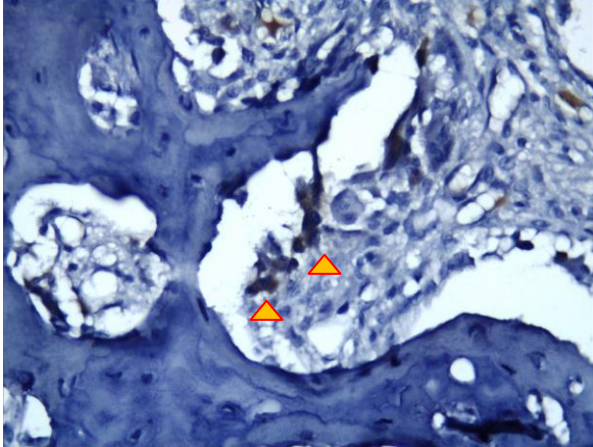
**Şekil-12:** Deney grubu, 30. gün, yetersiz kartilaginöz kallus dokusu (HEX10).



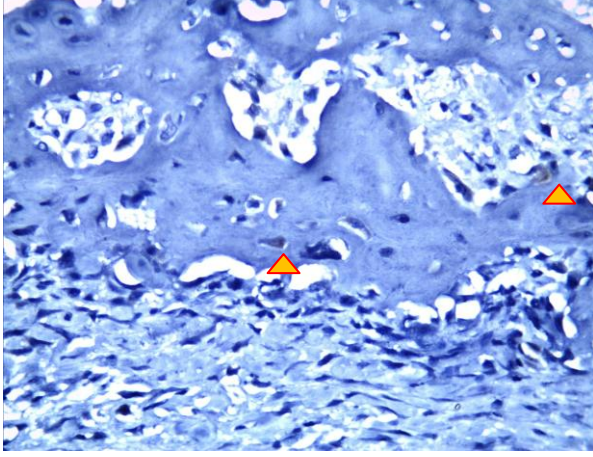
**Şekil-13:** Kontrol grubu, 30. gün, kontrol grubunda kartilaginöz kallus dokusunda endokondral ossifikasyon (HEX20).



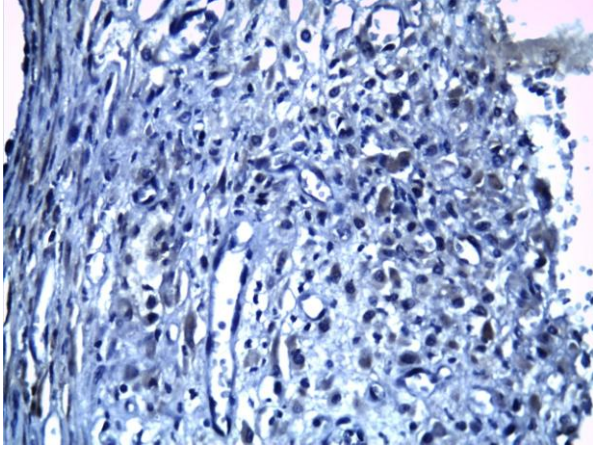
**Şekil-14:** Deney grubu, 16. gün, kemik trabekülleri çevresindeki osteoblast ve osteoklastlarda hafif derecede VEBF pozitifliği (VEGFX10), **OK:** VEBF aktivitesi.



**Şekil-15:** Deney grubu, 16.gün (VEBFX20), **OK:** VEBF aktivitesi.



**Şekil-16:** Kontrol grubu, 16. gün, kemik trabekülleri çevresindeki osteoblastlarda VEBF pozitifliği (VEBFX20), **OK:** VEBF aktivitesi.



**Şekil-17:** Deney grubu, 16. gün, distraksiyon bölgesindeki mezenşimal hücrelerde VEBF pozitifliği (VEBFX20).

**Tablo-1:** Sıçanlarda kemikleşme düzeylerinin gruplara göre dağılımı.

Gün	Sıçan no:	Kontrol		Deney	
		İntramembranöz ossifikasyon	Endokondral ossifikasyon	İntramembranöz ossifikasyon	Endokondral ossifikasyon
16	1	Yeterli	-	Yeterli	-
	2	Yetersiz	+	Yetersiz	+
	3	Yeterli	-	Yeterli	-
	4	Yetersiz	-	Yeterli	-
	5	Yeterli	-	Yeterli	+
	6	Yetersiz	-	Yeterli	-
30	1	Yeterli	-	Yeterli	-
	2	Yetersiz	+	Yeterli	+
	3	Yetersiz	+	Yetersiz	-
	4	Yetersiz	-	Yetersiz	-
	5	Yeterli	-	Yeterli	+
	6	Yeterli	+	Yeterli	-

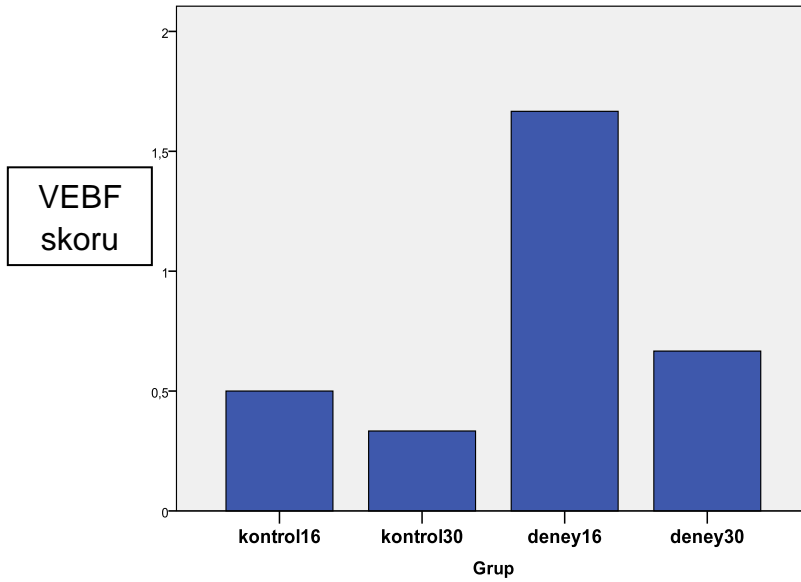
**Tablo-2:** Gruplarda kemikleşme oranları.

	Deney		Kontrol	
	16. Gün	30. Gün	16. Gün	30. Gün
<b>İntramembranöz kemikleşme (%)</b>	83	67	50	50
<b>Endokondral kemikleşme (%)</b>	33	33	16	50

**Tablo-3:** Gruplarda vasküler endotelial büyüme faktörü (VEBF) skorları.

Sıçan no:	Kontrol		Deney	
	16.gün	30.gün	16.gün	30.gün
1	1	1	1	1
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
Grup ortalaması	0.5*	0.3	1.7*	0.67

\*: p=0.02



**Şekil-18:** Grupların günlere göre vasküler endotelial büyüme faktörü (VEBF) düzeyleri.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda sıçanda distraksiyon osteogenezisi modelinde hızlı uzatma sırasında oral yolla kullanılan aktif bir prolil hidrosilaz inhibitörü olan FG-2216'nın VEBF aktivitesi üzerindeki etkinliği gösterildi. Anjiogenezis kaskadının üst basamakları HIF'e bağımlı olarak işlemektedir. Prolil hidrosilazın inhibisyonu, HIF'ün stabilizasyonu ve bu yolla VEBF gen ekspresyonunun aktivasyonu ile sonuçlanır. Bu açıdan çalışmamız lokal VEBF uygulamalarına göre daha etkin bir anjiogenezis uyarılması içermektedir. Bunun yanında VEBF, anjiogenezisin uyarılması için gerekli ancak tek başına yeterli olmayan bir faktördür. FG 2216 ise, daha önce anemi tedavisinde uygulama alanı bulan ancak henüz klinik olarak yaygın kullanıma girmemiş bir ajandır. Bir çalışmada FG-2216 verilen kronik renal yetmezlikli hastalarda plazma eritropoetin düzeylerinde 30,8 ve sağlıklı gönüllülerde 12,7 kat artış olduğu tespit edilmiştir (66). Diğer bir tip prolil hidrosilaz inhibitörünün ise fareler üzerinde yapılan bir çalışmada kanser hücrelerinin proliferasyonunda azalmaya yol açarak nöroprotektif özellik gösterdiği belirtilmiştir (69).

FG-2216, bu çalışma ile ilk kez bir DO modelinde kullanılmıştır. HIF mekanizması üzerinde kurgulanan benzer çalışmalarla karşılaştırıldığında, anjiogenezisin oral kullanılan bir kimyasal madde ile uyarılması noninvazif bir yöntem olarak, pratik uygulama açısından değerli bir özellik olup genetik manipulasyonlar ve lokal uygulamalara göre avantajlıdır. Gelecekteki klinik uygulamalarda distraksiyon osteogenezisini hızlandıran bu tür oral ajanların önem kazanacağı düşünülebilir.

DO yöntemi ile ekstremitte uzatılmasında biyomekanik etkenlerin sonuca etkisi çok önemlidir. Bu biyomekanik etkenler başlıca, DO sürecinde yer aldıkları sıraya göre, uzatma başlatılmadan önce geçirilen bekleme (latensi) döneminin süresi, uzatma sırasında uygulanan distraksiyonun hızı ve ritmi ve uzatma sonlandırıldıktan sonra osteotomi aralığında oluşan rejeneratın olgun kemiğe dönüşmesi için geçirilen konsolidasyon döneminin

süresi olarak özetlenebilir. Anjiogenezis bu sürecin başından sonuna önemli bir işlev üstlenmekle beraber, özellikle mekanotransduksiyon fenomeninin etkilerinin en kuvvetli olduğu distraksiyon döneminde öncü rol oynamaktadır. Bu dönemde osteotomi bölgesine yansıyan gerilme kuvvetlerinin biyolojik sinyallere dönüştürülerek hücresele düzeyde oluşturdukları etki, doğal olarak kemik uçları arasındaki mesafenin değişmediği konsolidasyon dönemine göre daha fazladır. Çalışmamızda bu dönemsel farklılık 16. ve 30. günde saptanan VEBF aktivitelerinde de görüldü. Deney grubunda erken dönemde HIF stabilizasyonu ile devam ettirilen VEGF aktivitesi geç döneme göre daha yüksekti. Bu bulgu oral yoldan uygulanan sistemik bir ajan ile biyomekanik koşulların yarattığı olumsuz koşullara rağmen anjiogenezisin uyarılabileceğini kanıtlamaktadır. Warren ve ark. (70) sıçanda tedrici uzatma ile yapılan DO ve akut ekstremitte uzatmasını karşılaştırarak VEBF aktivitesinin her iki durumda da devam ettiğini göstermişlerdir. Çalışmamızda da kontrol grubunda hızlı DO uygulanmasına rağmen VEBF ekspresyonunun devam etmesi bu sonucu desteklemektedir.

Deneyin ilerleyen döneminde, sistemik HIF stabilizasyonunun devam ettirilmesine ve 15 günlük bir konsolidasyon dönemi geçirilmesine karşın, 30 gün sonunda beklenen düzeyde yeni kemik oluşumu elde edilememesinin en önemli nedeninin yaratılan olumsuz mekanik koşullara bağlı olduğu düşünülmüştür. Deneyde kurgulanan bu olumsuz mekanik etki, mikro çevre koşullarını çeşitli düzeylerde etkileyerek yeni kemik oluşumu mekanizmasında genel bir blokaj yaratmıştır. Deney grubunda saptanan VEGF aktivitesinin, deney sonuna dek daha yüksek düzeyde saptanmış olmasına rağmen, yeni kemik oluşumunu değerlendiren histolojik ölçütlerin deney ve kontrol grupları arasında belirgin bir fark göstermemesi ve iki grupta da zayıf bir kemikleşme gözlemlenmesi bize FG-2216'nin etkinliğini göstermekle beraber yalnız yeni damar oluşumunun uyarılmasının veya desteklenmesinin diğer koşullardaki olumsuzlukların tümünü dengeleyebilecek bir etki gösteremediğini işaret etmektedir.

Daha önceki çalışmalarda DO'ne olumlu etki yaratabilecek ajanlar araştırılmış; bifosfonatlar, pamidronat, zolendronik asit, 25-dihidroksivitamin



D3, büyüme hormonu, fibroblast büyüme faktörü-b, ve insülin benzeri büyüme faktörü-1'in bu amaçla kullanılabileceği gösterilmiştir (71-76). DO'de osteoblastların kallus dokusuna transplantasyonu (77) ve demineralize kemik matriksinin greft olarak kullanıldığı (78) başarılı deneysel çalışmalar da bulunmaktadır. Bir başka çalışmada nikotin uygulamasının DO'nde rejenere olan kemik mineralizasyonunda bozulmaya yol açtığı gösterilmiştir (79).

Anjiogenezis üzerine yoğunlaşan çalışmalarında Wan ve ark.(80), genetik olarak HIF'den yoksun osteoblastlı farelerde kemik hacminde azalma geliştiğini tespit etmişlerdir. Tavşan, fare ve sıçan üzerinde yapılan çeşitli çalışmalarda kırık iyileşmesi ve kemik defekti modellerinde VEBF'ün lokal olarak uygulanmasının anjiogenezis ve kemik iyileşmesini olumlu etkilediği belirtilmiştir(15). Fassbender ve ark.(81) bir anjiogenezis inhibitörü olan Fumagillin kullanarak yaptıkları çalışmada sıçanların tibialarında osteotomi sonrası 84. güne kadar osteotomi hattında görülebilir boşluk tespit etmişler ve atrofik kaynamama geliştiğini bildirmişlerdir.

Mekanotransdüksiyon fenomeni ile oluşan proliferatif ve biyosentetik hücresel fonksiyonların uyarılması henüz net olarak açıklanamamış olmakla birlikte, mekanik stres devam ettiği sürece yeni kemik oluşumu için sinyal üretiminin de artarak etki göstermesi beklenir. Bu aşamada distraksiyon hızı ve frekansı önem kazanmaktadır. Distraksiyon alanındaki hücresel mikroçevre koşulları, hız sabit kalmak şartıyla yüksek frekanslı bir distraksiyonda, düşük frekanslıya göre daha uzun süre korunmaktadır. Mekanik uyarı sıklığının artması alandaki kemik yapımı ve kan damarlarının oluşumunu daha çok uyarmaktadır (82).

Çalışmamızda günlük 0,8mm distraksiyon hızı kullanılmıştır. Kemirgenlerde ve özel olarak sıçanlarda uygulanacak distraksiyon osteogenezisinde, uzatmanın hızı ve ritmi ile ilgili çalışmalar yapılmış olmakla beraber kesinleşmiş optimum değerlerden bahsetmek olanaklı değildir. Bununla beraber sıçanlarda 0.5mm/gün uzatma miktarı, genel kabul gören optimal distraksiyon hızı olarak değerlendirilebilir (83, 84). Bu değerle kıyaslandığında 0.8-1.00mm/gün civarındaki uzatma miktarları hızlı distraksiyon uygulanması olarak nitelenir. Günlük 1.00mm'yi aşan uzatma

hızlarında ise distraksiyon bölgesinde geçerli olan biyomekanik etki nedeniyle beklenen yeni kemik oluşumuna güvenilemez. Hızlı distraksiyonda az miktarda kan damarı içeren zayıf organizasyona sahip granülasyon dokusunun erken oluşumu meydana gelmektedir (85). Distraksiyon ilerledikçe granülasyon dokusu, fibrokıkırdak ve kistler distraksiyon aralığını doldurmakta ve seyrek olarak kemik rejenerasyonu görülmektedir. Azalmış osteoblast aktivitesi, kıkırdak dokusu ve kistlerin varlığı distraksiyon aralığında kemik yapımını geciktirmekte, engellemekte ve sonuçta kaynamamaya yol açmaktadır (86-88).

Daha önce femur ve mandibula üzerinde yapılan ve DO'de anjiogenezis mekanizması üzerine yoğunlaşan benzer araştırmalarla karşılaştırıldığında bu çalışmada, kullanılan kemirgen türü için optimum sayılabilecek uzatma hızının üzerinde bir distraksiyon uygulanmıştır. DO'de uzatma hızı, yeterli yeni kemik oluşumunun sağlanabilmesi için optimum düzeyde olmalıdır. Paccione ve ark. 1.0 mm/gün hızındaki distraksiyon ile sıçan mandibulasında anjiogeneziste bozulma ve kötü kemik rejenerasyonu tespit ederken 0.5mm/gün hızında mükemmel sonuçlar bulmuşlardır (89). Tavşan tibiasında uygulanan bir DO modelinde, hızlı uzatmanın anjiogenezisi inhibe ettiği ve kemik oluşumunu bozduğu gösterilmiştir (90). Klinik ve deneysel olarak 1mm/gün'den daha hızlı distraksiyonlarda periosteum ve gelişmekte olan damarlarda hasarlanma, kemik kaynamasında gecikme ya da kaynamama rapor edilmiştir (91). Devamlı distraksiyon ve kesintili distraksiyonun tavşanlar üzerinde karşılaştırıldığı diğer bir çalışmada distraksiyonun devamlılığının sabit bir mekanik stres yaratarak daha çok osteoid oluşumuna yol açtığı yorumu yapılmıştır (92). Bu araştırmalar ile kıyaslandığında, çalışmamızda yeni kemik oluşumunun deney sonunda yetersiz düzeyde gelişmiş olması, uygulanan modelde uzatmanın günde iki kez olmak üzere kesintili bir ritm ile ve seçilen deney hayvanının optimal uzatma hızına göre daha süratli yapılmış olmasından kaynaklanmıştır. DO'nde yapılan her bir uzatma işlemi, osteotomize kemik uçlarının arasında gerilmeye ve bu bölgede gelişmekte olan yeni kemik dokusunda (rejenerat) mekanik strese neden olmaktadır. Günlük toplam uzatma miktarı

değişmemek kaydı ile uzatmanın frekansının artırılmasının, yani aynı uzama miktarının daha çok sayıda girişimle elde edilmesinin, rejenerat çevresindeki yumuşak dokulara daha az zarar verebileceği öne sürülebilir. Bu açıdan çalışmada distraksiyon hızının yüksek olmasının yanında frekansının da düşük tutulmuş olması (günde 2 kez) mekanik açıdan olumsuz bir mikro çevre yaratmıştır.

Çalışmadan elde edilen sonuçlar şu şekilde sıralanabilir:

1. HIF yolu üzerinden etki eden FG-2216, VEBF aktivitesini arttırarak anjiogenezisi uyarmaktadır.
2. FG-2216'nın sıçanda 30 gün süre ile oral kullanımı sırasında her hangi bir yan etki görülmemiştir.
3. Anjiogenezis yeni kemik oluşumunun başlatılması ve sürdürülmesi için en önemli mekanizmaların başında gelmekle birlikte, hızlı uzatmaya bağlı yetersiz biyomekanik koşullarda uyarılması ve HIF mekanizmasının korunması ideal bir kemik oluşumu için yeterli olmamıştır.

Çalışmanın zayıf yönü ideal distraksiyon hızının uygulandığı bir grupta karşılaştırma yapılmamış ve FG-2216'nın etkisinin standart bir DO modelinde gösterilmemiş olmasıdır. Uygun biyomekanik koşullar altında maddenin etkinliğini gösteren ek araştırmalar planlanabilir.

DO'nin klinik uygulamaları sırasında mekanik değişkenlerden uzatma hızı ve ritmi ile, kemikleşmenin biyolojik alt yapısının temel taşlarından birisi olan anjiogenezis birbirleriyle bağlantılıdır ve bağımsız düşünülmesi yanılığa yol açar. Bu iki etken uygun şekilde eşleşmelidir, ancak bu şekilde yeterli kemik homeostazisi elde edilebilmektedir. Bu mekanizmaların anlaşılmasında oldukça fazla ilerleme kaydedildiği halde halen henüz açıklanamamış mekanizmaların varlığı şüphesizdir. Yeni tasarlanacak araştırmalar ile HIF stabilizasyonunun DO'deki rolü daha net ortaya çıkacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Trueta J, Trias A. The vascular contribution to osteogenesis. The effect of pressure upon the epiphysial cartilage of the rabbit. *J Bone Joint Surg* 1961; 43: 800-13.
2. Trueta J, Buhr AJ. The vascular contribution to osteogenesis. The vasculature supplying the epiphysial cartilage in rachitic rats. *J Bone Joint Surg* 1963; 45: 572-581.
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. Schipani E, Ryan HE, Didrickson S, Kobayashi T, Knight M, Johnson RS. Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev* 2001; 15: 2865-76.
6. Codivilla A. On the means of lengthening in the lower limbs. *Am J Orthop Surg* 1905; 2: 353-69.
7. Ilizarov GA. Clinical application of the tension-stress effect for limb lengthening. *Clin Orthop Relat Res* 1990; 8-26.
8. Isefuku S, Joyner CJ, Simpson AH. A murine model of distraction osteogenesis. *Bone* 2000; 27: 661-5.
9. Aronson J, Hogue WR, Flahiff CM, et al. Development of tensile strength during distraction osteogenesis in a rat model. *J Orthop Res* 2001; 19: 64-9.
10. Vauhkonen M, Peltonen J, Karaharju E, Aalto K, Alitalo I. Collagen synthesis and mineralization in the early phase of distraction bone healing. *Bone Miner* 1990; 10:171-81.
11. Aronson J. Experimental and clinical experience with distraction osteogenesis. *Cleft Palate Craniofac J* 1994; 31:473-82.
12. Sato M, Yasui N, Nakase T, et al. Expression of bone matrix proteins mRNA during distraction osteogenesis. *J Bone Miner Res* 1998;13: 1221-31.
13. Ilizarov GA. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. The influence of stability of fixation and soft-tissue preservation. *Clin Orthop Relat Res* 1989; 238: 249-81.
14. Wang Y, Wan C, Deng L, et al. The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J Clin Invest* 2007; 117: 1616-26.
15. Gerber HP, Ferrara N. Angiogenesis and bone growth. *Trends Cardiovasc Med* 2000; 10: 223-8.
16. Takimoto A, Nishizaki Y, Hiraki Y, et al. Differential actions of VEGF-A isoforms on perichondrial angiogenesis during endochondral bone formation. *Dev Biol* 2009; 332: 196-211.
17. Ortega N, Behonick DJ, Werb Z. Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends Cell Biol* 2004; 14: 86-93.

18. Bergers G, Brekken R, McMahon G, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 737-44.
19. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, et al. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 1999; 5: 623-28.
20. Brandi ML, Collin-Osdoby P. Vascular biology and the skeleton. *J Bone Miner Res* 2006; 21: 183-92.
21. Eghbali-Fatourehchi GZ, Lamsam J, Fraser D, et al. Circulating osteoblast-lineage cells in humans. *N Engl J Med* 2005; 352:1959-66.
22. Utting JC, Robins SP, Brandao-Burch A, et al. Hypoxia inhibits the growth, differentiation and bone-forming capacity of rat osteoblasts. *Exp Cell Res* 2006; 312: 1693-1702.
23. Hunsuck EE. Vascular changes in bone repair. *J Oral Surg* 1969; 27: 572-74.
24. Rhinelander FW. Tibial blood supply in relation to fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 1974; 34-81.
25. Colnot CI, Helms JA. A molecular analysis of matrix remodeling and angiogenesis during long bone development. *Mech Dev* 2001; 100: 245-50.
26. Pacicca DM, Patel N, Lee C, et al. Expression of angiogenic factors during distraction osteogenesis. *Bone* 2003; 33: 889-98.
27. Jacobsen KA, Al-Aql ZS, Wan C, et al. Bone formation during distraction osteogenesis is dependent on both VEGFR1 and VEGFR2 signaling. *J Bone Miner Res* 2008; 23: 596-609.
28. Fang TD, Salim A, Xia W, et al. Angiogenesis is required for successful bone induction during distraction osteogenesis. *J Bone Miner Res* 2005; 20: 1114-24.
29. Wan C, Gilbert SR, Wang Y, et al. Activation of the hypoxia-inducible factor-1alpha pathway accelerates bone regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 686-91.
30. Ferguson C, Alpern E, Miclau T, Helms JA. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech Dev* 1999; 87: 57-66.
31. Tatsuyama K, Maezawa Y, Baba H, Imamura Y, Fukuda M. Expression of various growth factors for cell proliferation and cytodifferentiation during fracture repair of bone. *Eur J Histochem* 2000; 44: 269-78.
32. Street J, Bao M, deGuzman L, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 9656-61.
33. Gordan JD, Simon MC. Hypoxia-inducible factors: Central regulators of the tumor phenotype. *Curr Opin Genet Dev* 2007; 17: 71-7.
34. Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1alpha. *Cell Death Differ* 2008; 15: 621-7.
35. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 5510-4.

36. Kallio P J, Okamoto K, O'Brien S, et al. Signal transduction in hypoxic cells: Inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor- 1alpha. *Embo J* 1998; 17: 6573-86.
37. Berra E, Benizri E, Ginouves A, et al. Hif prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of hif-1alpha in normoxia. *Embo J* 2003; 22: 4082-90.
38. Lando D, Peet D J, Gorman JJ, et al. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* 2002; 16: 1466-71.
39. Kaelin WG. Molecular basis of the vhl hereditary cancer syndrome. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 673-82.
40. Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poellinger L. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 1999; 274: 6519-25.
41. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 721-32.
42. Bishop T, Lau K W, Epstein AC, et al. Genetic analysis of pathways regulated by the von hippel-lindau tumor suppressor in caenorhabditis elegans. *Plos Biol* 2004; 2: 289.
43. Greijer AE, van der Groep P, Kemming D, et al. Upregulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). *J Pathol* 2005; 206: 291-304.
44. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359: 843-45.
45. Semenza GL. Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Semin Cancer Biol* 2009; 19: 12-6.
46. Schipani E, Maes C, Carmeliet G, Semenza GL. Regulation of osteogenesis-angiogenesis coupling by HIFs and VEGF. *J Bone Miner Res* 2009; 24: 1347-53.
47. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219: 983-85.
48. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246: 1306-9.
49. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 1989; 246: 1309-12.
50. Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 2001; 114: 853-65.
51. Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not flk-1/kdr, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* 1997; 272: 23659-67.

52. Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 10705-9.
53. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, et al. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 187: 1579-86.
54. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669-76.
55. Eshkar-Oren I, Viukov SV, Salameh S, et al. The forming limb skeleton serves as a signaling center for limb vasculature patterning via regulation of VEGF. *Development* 2009; 136: 1263-72.
56. Tombran-Tink J, Barnstable CJ. Osteoblasts and osteoclasts Express PEDF, VEGF-A isoforms, and VEGF receptors: Possible mediators of angiogenesis and matrix remodeling in the bone. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316: 573-9.
57. Mayer H, Bertram H, Lindenmaier W, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) expression in human mesenchymal stem cells: Autocrine and paracrine role on osteoblastic and endothelial differentiation. *J Cell Biochem* 2005; 95: 827-39.
58. Grunewald M, Avraham I, Dor Y, et al. VEGF-induced adult neovascularization: Recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 2006; 124: 175-89.
59. Roodhart JM, Langenberg MH, Vermaat JS, et al. Late release of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells after chemotherapy predicts response and survival in cancer patients. *Neoplasia* 2010; 12: 87-94.
60. Li G, Cui Y, McIlmurray L, Allen WE, Wang H. RhBMP-2, rhVEGF(165), rhPTN and thrombin-related peptide, tp508 induce chemotaxis of human osteoblasts and microvascular endothelial cells. *J Orthop Res* 2005; 23: 680-85.
61. Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, et al. The transcription factor sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of sox5 and sox6. *Genes Dev* 2002; 16: 2813-28.
62. Maes C, Carmeliet P, Moermans K, et al. Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms vegf 164 and vegf188. *Mech Dev* 2002; 111: 61-73.
63. Maes C, Stockmans I, Moermans K, et al. Soluble vegf isoforms are essential for establishing epiphyseal vascularization and regulating chondrocyte development and survival. *J Clin Invest* 2004; 113: 188-99.
64. Zelzer E, McLean W, Ng YS, et al. Skeletal defects in VEGF(120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Development* 2002 129: 1893-1904.
65. Zelzer E, Mamluk R, Ferrara N, Johnson RS, et al. VEGF A is necessary for chondrocyte survival during bone development. *Development* 2004; 131: 2161-71.

66. Bernhardt WM, Wiesener MS, Scigalla P, et al. Inhibition of prolylhydroxylases increases erythropoetin production in ESRD. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 2151-6.
67. Philipp S, Jürgensen JS, Fietz J, 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.
68. Asmaa GA, Hayam A, Nancy A, et al. Immunohistochemical evaluation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in colorectal carcinoma. *Journal of the Egyptian Nat Cancer Inst* 2006; 18: 311-22.
69. Ma TC, Langley B, Ko B, et al. A screen for inducers of p21(waf1/cip1) identifies HIF prolyl hydroxylase inhibitors as neuroprotective agents with antitumor properties. *Neurobiol Dis* 2012; 49: 13-21.
70. Warren SM, Mehrara BJ, Steinbrech DS, et al. Rat mandibular distraction osteogenesis: part III. Gradual distraction versus acute lengthening. *Plast Reconstr Surg* 2001; 107: 441-53.
71. Little DG, Cornell MS, Briody J, et al. Intravenous pamidronate reduces osteoporosis and improves formation of the regenerated during distraction osteogenesis. A study in immature rabbits. *J Bone Joint Surg* 2001; 83:1069-74.
72. Williams PR, Smith NC, Cooke-Yarborough C, Little DG. Biphosphonates and nephrocalcinosis in a rabbit leg lengthening model: a histological and therapeutic comparison. *Pharmacol Toxicol* 2001; 89: 149-52.
73. Raschke MJ, Bail H, Windhagen HJ, et al. Recombinant growth hormone accelerates bone regenerate consolidation in distraction osteogenesis. *Bone* 1999; 24: 81-8.
74. Yamane K, Okano T, Kishimoto H, Hagino H. Effect of ED 71 on modeling of bone in distraction osteogenesis. *Bone* 1999; 24: 187-93.
75. Okazaki H, Kurokawa T, Nakamuro K, et al. Stimulation of bone formation by recombinant fibroblast growth factor-2 in callotaxis bone lengthening of rabbits. *Calcif Tissue Int* 1999; 64: 542-46.
76. Steward KJ, Weyand B, Hof RJ, 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* 2000; 52: 343-50.
77. Tsubota S, Tsuchiya H, Shinokawa Y, et al. Transplantation of osteoblast like cells to the distracted callus in rabbits. *J Bone Joint Surg* 1999; 81:125-9.
78. Hagino T, Hamada Y. Accelerating bone formation and earlier healing after using demineralized bone matrix for limb lengthening in rabbits. *J Orthop Res* 1999; 17: 232-7.
79. Kucukdeveci O, Sarisozen B, Atici T, Ozcan R. The effect of nicotine on distraction osteogenesis: an experimental study on rabbits. *J Trauma* 2009, 67: 1376-83.
80. Wan C, Gilbert S R, Wang Y, et al. Activation of the hypoxia-inducible factor-1alpha pathway accelerates bone regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 686-91.



81. Fassbender M, Strobel C, Rauhe JS, et al. Local inhibition of angiogenesis results in an atrophic non-union in a rat osteotomy model. *European Cells and Materials* 2011; 22: 1-11.
82. 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.
83. Knothe Tate, M L, Niederer P, Knothe U. In vivo tracer transport through the lacunocanalicular system of rat bone in an environment devoid of mechanical loading. *Bone* 1998; 22: 107-17.
84. Devkota P, Zeng BF, Tang JF, Fan CY. Histological changes of the skeletal muscle due to muscle tension: A study in rats. *Kathmandu University Medical Journal* 2005; 3: 281-4.
85. Aronson J, Shen XC, Skinner RA, et al. Rat model of distraction osteogenesis. *J Orthop Res* 1997;15: 221-226.
86. Aronson J. Experimental and clinical experience with distraction osteogenesis. *Cleft Palate Craniofac J* 1994;31:473-82; 481-482.
87. Li G, Simpson AH, Kenwright J, et al. Assessment of cell proliferation in regenerating bone during distraction osteogenesis at different distraction rates. *J Orthop Res* 1997;15:765-72.
88. Choi IH, Shim JS, Seong SC, et al. Effect of the distraction rate on the activity of the osteoblast lineage in distraction osteogenesis of rat's tibia. Immunostaining study of the proliferating cell nuclear antigen, osteocalcin, and transglutaminase c. *Bull Hosp Jt Dis* 1997; 56: 34-40.
89. Paccione MF, Mehrara BJ, Warren SM, et al. Rat mandibular distraction osteogenesis: latency, rate, and rhythm determine the adaptive response. *J Craniofac Surg* 2001;12: 175-82.
90. Li G, Simpson AH, Kenwright J, et al. Effect of lengthening rate on angiogenesis during distraction osteogenesis. *J Orthop Res* 1999;17: 362-7.
91. Aronson J. Temporal and spatial increases in blood flow during distraction osteogenesis. *Clin Orthop* 1994; 301: 124-31.
92. Djasim UM, Mathot BJ, Wolvius EB, et al. Histomorphometric comparison between continuous and discontinuous osteogenesis. *J craniomaxillofac Surg* 2009; 37: 398-404.

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca üzerimde yoğun emekleri olan başta tez danıŐmanım Prof. Dr. Bartu Sarısözen, Prof. Dr. Kemal Durak, Prof. Dr. Ömer Faruk Bilgen, Prof. Dr. Burak Demirağ, Prof. Dr.Tufan Kaleli, Doç. Dr. Sadık Bilgen, Doç. Dr. Burak Akesen'e ve tez hazırlıklarımnda yardımcı olan Doç. Dr. Ulviye Yalçınkaya'ya, tüm asistan arkadaşlarıma, tüm anabilim dalı çalışanlarına ve en çok da bu dönemdeki sevinç ve sıkıntılara ortak olan anneme, babama ve kardeşime teşekkürlerimi sunarım.

*Dr. Ahmet ÖZDEL*

## ÖZGEÇMİŞ

6 Eylül 1981 Bandırma'da doğdum. Eğitimimi sırasıyla Bandırma Evyapan İlkokulu, Bandırma Kültür ve Eğitim Vakfı Özel Lisesi'nde tamamladım. 1999'da başladığım üniversite öğrenimimi, 2005 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde bitirdikten sonra Haziran 2007'de Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak uzmanlık eğitimime başladım ve 2012 yılında Ortopedi ve Travmatoloji uzmanı oldum.