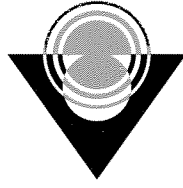


2007-241
CD 1. ser.



TÜBİTAK

TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU
THE SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu
Health Sciences Research Group

90720

Proje No: 105S437(SBAG-3244)

Sıçanlarda geliştirilen femoral kortekste defekt modelinde Wnt/beta catenin sinyal yolu proteinlerinin Bone morfojenik protein (BMP) ve paratiroid hormonu ile ilişkisi

Doç.Dr. Neşe Demirkan
Doç.Dr. Fahir Demirkan
Arş.Gör.Dr. Ayşegül Aksoy
Arş.Gör.Dr. Mehmet Özdemir

HAZİRAN, 2007
DENİZLİ

Önsöz : Tübitak tarafından desteklenen bu çalışma, Pamukkale Üniversitesi Deneysel hayvanları ve Patoloji AD laboratuvarlarında 01.05.2006 - 01.05.2007 tarihleri arasında gerçekleştirilmiş ve sonuçlar 01.07.2007 tarihinde rapor haline getirilmiştir. Çalışma raporu makale formatına getirilerek SCIE kapsamında uluslararası bir dergiye, yayınlanmak üzere gönderilmiştir. Moleküler çalışmalarla ortaya atılan bazı bilgilerin, in vivo koşullarda da doğrulanmasını sağlayan bu önemli çalışmanın TÜBİTAK desteği sayesinde gerçekleştiği makale formatında belirtilmekte olup, makale haline geldiği zaman TÜBİTAK' a ayrıca bilgi verilecektir.

İçindekiler:

	syf
I. Başlık Sayfası.....	1
II. Önsöz.....	2
III. İçindekiler.....	3-4
IV. Özet (Abstract).....	5
V. Giriş ve Genel bilgiler	6-7
VI. Gereç ve Yöntem.....	8-9
a. Deneysel Model.....	8
i. Önçalışma	
ii. çalışma	
b. Histokimyasal ve İmmunohistokimyasal Morfolojik değerlendirme.....	9
VII. Bulgular	10-12
VIII.	
a. H%E ile yapılan morfolojik değerlendirme.....	10-11
i. Grup A	
1. Birinci Hafta	
2. İkinci Hafta	
3. Üçüncü Hafta	
ii. Grup B	
1. Birinci Hafta	
2. İkinci Hafta	
3. Üçüncü Hafta	
iii. Grup C	
1. Birinci Hafta	
2. İkinci Hafta	
3. Üçüncü Hafta	
b. İmmunohistokimyasal Değerlendirme.....	11-12
i. BMP	
ii. PTH	
iii. B katenin	
iv. Tcf-4	
IX. Tartışma ve sonuç.....	13-14
X. Referanslar.....	15-16
XI. Tablo 1.....	17
XII. Tablo 2.....	18
XIII. Tablo 3.....	19
XIV. Tablo 4.....	20

XV. Tablo 5.....	21
XVI. Resim 1.....	22
XVII. Resim 2.....	23
XVIII. Resim 3.....	24
XIX. Resim 4.....	25
XX. Proje Özet Bilgi Formu.....	26

Özet:

Kırık iyileşmesinde, Paratiroid hormonu(PTH) ve bone morfojenik proteinin (BMP) anabolik etkilerini aydınlatmak için yoğun moleküler çalışmalar yapılmaktadır. Biz de bu çalışmada BMP-2'nin kallusu oluşturan hücrelerdeki BMP-2, PTH, beta-katenin ve Tcf-4 ekspresyonlarını in vivo olarak araştırmayı amaçladık. Lokal olarak rhBMP-2 proteinini, taşıyıcı madde kullanmaksızın, 42 erkek Sprague Dawley rat femuruna enjekte ederek, kontrol grubuna göre daha fazla periost reaksiyonu olan kırık iyileşme modeli oluşturduk ve bunu immunohistokimyasal olarak anti-BMP-2 ekspresyon artışı şeklinde kanıtladık. İlginç olarak lokal rhBMP-2 uygulanan ratlarda, sistemik etki ile karşı femurlarında da periost reaksiyonu artışı oldu. Yine rhBMP-2 uygulanan grupta, osteoklastlar da dahil bütün kallusu oluşturan hücrelerde PTH ekspresyon artışı ve periostal kemikleşme bölgesindeki kondrositlerde nükleer beta-katenin artışı görüldü. Böylece rhBMP-2'nin PTH ve Wnt sinyal yolu ile pozitif yönde etkileştiğini dokuda göstermiş olduk. Ancak bundan sonraki çalışmalar rhBMP-2'nin farklı kırık modellerine göre etkisinin değişip değişmediği sorusunun yanı sıra, lokal rhBMP'nin ne tür sistemik etkileri vardır sorusuna da yanıt aramalıdır.

Anahtar kelimeler: Bone morfojenik protein, kırık iyileşmesi, beta-katenin, Wnt sinyal yolu, paratiroid hormonu

Abstract:

During the fracture healing, various studies to demonstrate anabolic effects of the parathyroid hormone(PTH) and bone morphogenic protein have been done. In this study, we have tried to investigate the expressions of BMP-2, PTH, beta-catenin ve Tcf-4 invivo at the cells forming callus after the injection with rhBMP-2. Local rhBMP-2 protein injection without using carrier material have been done at 42 Sprague-Dawley rat, fracture healing model having more periosteal reaction than the control group and this have been proven with anti BMP-2 expression increase immunohistochemically. Interestingly, at the rats with local rhBMP-2 protein injection, there was increased periosteal reaction contralaterally due to systemic effects. Also, among the rhBMP-2 applied group, PTH expression increase at the callus forming cells including osteoclasts and nuclear beta-catenin increase at the chondrocytes of periosteal ossification region. Thus, positive interactions of rhBMP-2 with PTH and Wnt signaling pathway at tissue level have been demonstrated. However, future studies should try to find whether the effects of rhBMP-2 change according to different fracture models, besides should question the systemic effects of local rhBMP-2.

Key words: bone morphogenic protein, parathyroid hormone

Giriş:

Uzun yıllardan beri kırık iyileşmesini hızlandırmak ve kolaylaştırmak için bir çok çalışmalar yapılmaktadır. Kırık iyileşmesi, kırık ve yeni kemik oluşumuyla sağlanır. Kallus olarak isimlendirilen bu yeni oluşan dokuda enflamatuar hücreler, anjiyoblastlar, fibroblastlar, kondroblastlar ve osteoblastların çoğalması ve farklılaşması söz konusudur. Einhorn kırık iyileşmesine katılan dört ayrı doku tariflemektedir; 1) kortikal kemik, 2) periosteum, 3) differansiye olmamış kırık çevresi fasiyal dokular ve 4)kemik iliği. Eğer kırıkta internal fiksasyon uygulanırsa kırık iyileşmesi primer kortikal kemik ile sağlanır. Internal fiksasyon olmadığı zaman diğer dokuların katkıları ile encondral ve intramembranöz kemikleşme gelişir (EINHORN, 2005). Farklı görüşlere göre kırık bölgesinde ilk olayın her koşulda periosteumda ve kırık alanı çevresindeki mezenseşimal hücrelerde hücre çoğalması şeklinde olduğu varsayılmaktadır. Periosteal hücreler çoğaldıktan sonra kondrosit ve osteositlere farklılaşırlar. Klasik olarak kırık iyileşmesinin ilk 7-10'uncu gününde periosteum intramembranöz kemik oluşumuna gider; histopatolojik olarak incelendiğinde korteksin karşısında, kırık noktasından birkaç mm lik mesafede woven kemik olarak izlenir. Aynı zamanda komşu periost ve eksternal yumuşak dokudan katkıda bulunan ve kırık bölgesini kaplayan kallus içinde kırık ortaya çıkmaya başlar. İkinci haftanın ortalarına doğru abondan miktardaki kırık bölgesini doldurur ve bu kondroid doku, kalsifikasyonun biyokimyasal hazırlığını başlatır. Bu noktada kallus ikiye ayrılır: intramembranöz ossifikasyonun rol aldığı sert kallus ve encondral ossifikasyonun rol aldığı yumuşak kallus. Osteoklastlar yeniden şekillenmede büyük rol oynarlar. Yeni kemik oluşumu tiplerinden biri olan encondral kemikleşmede kırık iyileşirken kırık dokusu yerini olgunlaşan kemik dokuya bırakır (MEYER, 2003). Encondral kemikleşme uzun kemik kırıklarında sık görülen bir iyileşme şeklidir (NUNAMAKER, 1998).

Kemik oluşumu için gereken Indian hedgehog (Ihh) gibi embryonik genler, kırık iyileşmesinde aktifleşirler ve bone morphogenetic proteinleri (BMP) ve transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) 'i uyarırlar (MEYER, 2003). BMP'nin kemik oluşumundaki rolünü ilk kez Urist ve ark.ları ortaya koymuşlardır.(URIST, 1983)). Zamanla yirmi civarında alt tipi tarif edilmiştir. Kırık iyileşmesinde BMP reseptörleri artar. BMP'lerin kemik indüksiyonundaki rolü, artrodez sonrası füzyonu sağlamaları ve kırığı iyileştirmeleri, bu proteinlerin iyileşme sırasında anahtar role sahip olduğu fikrini desteklemektedir. Kırık iyileşmesinin tek lokal perkütan rhBMP-2 enjeksiyonu ile artırıldığı bir çok çalışmada gösterilmiştir (EINHORN, 1997, BOSTROM, 1998, OPRAN, 2002). BMP osteoblast proliferasyonunu ve farklılaşmasını uyarır. BMP-2 plüripotent öncü hücre serilerinde otokrin Wnt1 ve Wnt3a ekspresyonunu uyarmaktadır. BMP-2 ekspresyonu embryonik kırık ve kemik oluşumu, ve kemik tamiri olan bölgelerde görülür (MEYER, 2003). Yine in vitro çalışmalar BMP-2'lerin α - β - γ kateninleri indüklediğini göstermiştir (FISCHER, 2001).

Wnt sinyal yolu üç hücre içi yolu kapsar: kanonik yol(Wnt/ β -katenin yolu), Wnt/planar hücre- polaritesi (PCP) yolu, ve Wnt/Ca²⁺ yolu. Kanonik yolun kemik oluşumunda; özellikle kondrosit differansiyasyon ve proliferasyonunda ana role sahip olduğu düşünülmektedir (ZHONG, 2006). Kanonik Wntler LRP5 reseptör kompleksine bağlanır, glikojen sentetaz kinaz 3 β 'yı inhibe ederek fosforilasyonu engeller ve sonuçta hücre içi β -katenin birikir. Biriken β -katenin çekirdek içerisine yer değiştirir ve hedef genleri T-hücrelerin transkripsiyon faktörü (Tcf) ve lenfoid uyarıcı faktör (Lef) ailesinin oluşturduğu kompleksi aktive eder (OHNAKAA, 2005).

Wnt'ler iskelet gelişiminin ekstremiteler oluşumundan, kondrogenez ve osteoblast maturasyonuna kadar çeşitli aşamalarında düzenleyici olarak oldukça önemli rollere sahiptir (WESTENDORF, 2004). Wnt sinyal yolunun osteokondrojenik hücre büyüme ve

gelişmesinde kilit rol oynadığı bilinmekle birlikte endokondral ossifikasyon sırasındaki fonksiyonu çok açık değildir. Sadece yapılan in vitro çalışmalarda Wnt/beta katenin sinyal yolunun kondrosit matürasyonunu düzenlediğini gösteren sonuçlar elde edilmiştir (DONG, 2005).

Osteoblastların Wnt sinyal yoluna verdiği cevapları gösteren deneysel veriler, plüripotent öncü hücrelerin BMP-2 veya diğer osteojenik uyarı varlığında osteoblasta dönüşümü ile elde edilmiştir. Stabil Wnt1, Wnt3a, Wnt6 or Wnt7b ekspresyonu plüripotent öncü hücrelerinin büyüme hızını artırmaktadır. Bazı Wntler (Wnt1, Wnt2, ve Wnt3a) osteoblast farklılaşmasında erken bir olay olan alkalen fosfataz (ALP) aktivitesini uyarır (WESTENDORF, 2004).

Paratiroid hormonunun iskelette anabolik ve katabolik etkileri uzun zamandır bilinmektedir. PTH'n sürekli verilmesi veya salınması primer hiperparatiroidi oluşturarak, osteoklast hücre sayısında ve aktivitesinde artışa yol açar. Bununla birlikte, düşük aralıklı dozlarda PTH verilmesi ratlarda ve insanlarda kemik yapımında artışa yol açtığı bildirilmektedir (HOLZER, 1999, KULKARNI, 2005). PTH veya PTH ilişkili proteinlerin endokondral kemikleşmede ve büyük olasılıkla kırık iyileşmesinde önemli rolü olduğu yönünde çalışmalar mevcuttur (MARCELL, 2007).

Özet olarak moleküler düzeyde, Wnt/beta katenin sinyal yolunun kondrosit farklılaşmasında ve kemik hücre fonksiyonunda kritik rolü oynadığı ve BMP'in kırık iyileşmesini kolaylaştırdığı artık bilinmektedir. Ancak hem anabolik, hem de katabolik rolü olan paratiroid hormonun kemik iyileşmesi sırasında hangi hücreler aracılığı ile, hangi faktörler ile ilişkili olarak bu olaya katkı sağladığı henüz açık değildir.

Bu çalışmada femurda kortikal kemikte defekt oluşturarak standart, kontrollü kırık iyileşmesinin gözlenmesi amaçlanmıştır. Birinci grupta sadece kortikal defekt oluşturulan femur, ikinci grubun sadece kortikal defekt oluşturulan femuru ile karşılaştırıldığı zaman, periostal reaksiyon ve protein ekspresyonları açısından önemli farklılıklar gözlenmiş ve ilginç olarak lokal BMP enjeksiyonunun aynı ratın karşı taraf femurundaki periost reaksiyonunu da etkilediği saptanmıştır.

Gereç ve Yöntem:

Deneysel model:

Ön çalışma:

Temmuz 2006 tarihinde bir ratta bilateral femoral kortekste delik oluşturmak amacı ile ön çalışma yapıldı. Yöntem planlandığı gibi Kishner teli kullanılarak uygulandı, ancak femurda tam kırık oluştu. İkinci ratta aynı yöntem daha dikkatli bir şekilde ve tel kalınlığı(3mm) kademeli olarak arttırılarak uygulandı. Bu sefer kırık olmaksızın, sadece kortikal kemikte defekt oluşumu sağlandı ve deneyin sıfıncı günü bulgularını saptamak için denek sakrifiye edildi. Üçüncü ratta ise oturtulan yöntem tekrar uygulandıktan sonra denek iki hafta sonra sakrifiye edildi. Her iki taraf femuru fikse edildikten sonra %10'luk EDTA ile dekalsifiye edildi. Yaklaşık on gün sonra, dekalsifikasyon sonrası yumuşayan kemiklerden örnek alındı, doku takibi yapıldı ve kasetler immunhistokimyasal boyalar için optimum konsantrasyonu saptamada kullanıldı. 05.10.06 tarihinde optimal antikor dilüsyonları aşağıdaki şekilde standardize edildi:

BMP antikor: 1/100, EDTA

TCF-4 antikor: 1/250, blokan, sitrat

PTH antikor: 1/400, blokan, sitrat,

β -katenin: 1/100 sitrat.

Çalışma:

Çalışmada üç aylık, 234-305gr ağırlıkları arasında 42 erkek Sprague Dawley rat kullanıldı.(10). Ratların anestezisi ketamin (yaklaşık 30 mg/kg) and xylazine (yaklaşık 5 mg/kg) intraperitoneal enjeksiyonu ile yapıldı. Sol bacakta önden insizyon yapıldı ve quadriseps mediale ekarte edildi. Ratlar iki gruba ayrıldı. İlk grupta, 21 ratın bir taraf bacağına femura distal 1/3- orta 1/3 birleşim bölgesinde K-teli ile 3 mmlik delik açıldı. Karşı taraf femur eksplore edilip, sadece periost sıyrılarak kortekse ulaşıldı, ancak kemiğe hiç defekt yapılmadan kapatıldı (Grup A).

İkinci grupta, 21 ratın sırasıyla her iki femurun distal 1/3- orta 1/3 birleşim bölgesinde K-teli ile 3 mmlik delik açıldı. Delik açtıktan sonra beş dakika boyunca bu bölgede kanın pıhtılaşması beklendi. Daha sonra sağ taraf femur içine insülin iğnesi ile pıhtı içine 30mikrolitre RH BMP-2 enjekte edildi (Resim 1) (Grup B). Karşı femura ise kontrol solüsyonu steril 18M H₂O enjekte edildi (Grup C). Her iki taraf femura müdahaleden sonra yumuşak dokular sütür ile kapatıldı. (11). Ratlar birinci, ikinci ve üçüncü haftaların sonunda yedişerlik gruplar halinde sakrifiye edildi. Deneklerin her iki femurları disseke edildi ve +4° C derecede paraformaldehit içinde 12-24 saat fikse edildi. Bu arada makroskopik incelemede femurlarda tam kırık yada kırık sonrası psödoartikülasyon geliştiği saptanan olgular saptandı ve bu sayıdaki rat ile tekrar ek çalışma yapılarak istenmeyen kırık gelişen olguların yerine yeni olgular eklendi. Farklı iki zaman diliminde, ancak aynı koşullarda çalışılmış toplam 42 olguluk deney sonucunda 84 adet femur örneği fiksasyon sonrası %10'luk EDTA (etilen diamin-tetra asetik asit) ile yaklaşık on günlük bir süre içinde dekalsifiye edildi.

Histokimyasal ve İmmunohistokimyasal morfolojik değerlendirme:

Yeterli fiksasyon, dekalsifikasyon işlemlerinden sonra, femur kemiklerinden longitudinal eksen boyunca delik bölgesini içeren kesitler alındı ve kasetlere konan örnekler otomatik doku takip girdi ve ertesi gün kasetlerden parafin bloklar hazırlandı. Parafin bloklardan mikrotom ile 4 mikrometre kalınlığında alınan kesitlerde önce Hematoksilen&Eozin boyaları ile morfolojik değerlendirme yapıldı. Bütün morfolojik değişikliklerin varlığı ve şiddeti semikantitatif olarak derecelendirildi. (Ör: hafif/orta/şiddetli miktarda osteoblast proliferasyonu, periost reaksiyonu vb). Diğer pozitif yüklü lamlara alınan kesitler ise anti-BMP, anti-PTH, anti- β -katenin ve anti-TCF antikoları ile otomatik Ventana NexES immunostainer cihazında boyandılar. Kromojen olarak Diaminobenzidin (DAB) kullanıldı. Hematoksilen&Eozin boyası ile her grup kendi içinde defektli bölgedeki vaskülarizasyon (hematom), woven kemik ve lameller kemik varlığı açısından değerlendirildi. Ayrıca kırık bölgesindeki hücreler miktarlarına göre semikantitatif olarak skorlandı.

Periosit reaksiyonu: Semikantitatif olarak altı derecede değerlendirildi: +: hafif mezenkimal hücre proliferasyonu, ++: orta derecede mezenkimal hücre proliferasyonu, +++: şiddetli mezenkimal hücre proliferasyonu, ++++: kondroid farklılaşması , +++++: osteoid farklılaşması, ++++++: woven tipde kemikleşme.

Osteosit , osteoblast, osteoklast, kondrosit ve fibroblast hücre sayısı da semikantitatif olarak hafif artış(+), orta derecede artış(++) ve belirgin artış (+++) olmak üzere üç skor üzerinden değerlendirildi.

İmmunohistokimyasal değerlendirme yapılırken aynı şekilde kallus bölgesindeki her hücre tipinde semikantitatif olarak, immun reaksiyon sitoplazmik/nükleer/membranöz olmak üzere değerlendirildi. Her olguda defekt komşuluğundaki sağlam kortikal kemikte bulunan osteositlerde ant-BMP, anti-Tcf-4 ile nükleer ekspresyon saptandı ve bu pozitiflik internal kontrol olarak her kesitte arandı. PTH ise yine komşu normal lameller kemikteki osteositlerde sitoplazmik pozitiflik gösteriyordu.

Boyama şiddeti fokal/diffüz ve hafif/orta/şiddetli olmak üzere ayrı ayrı belirlendi. Bütün gruplardan elde edilen sonuçlar, Mann Whitney U testi ile SPSS programında kendi aralarında ilişkilendirildi. P değeri 0,05'in altındaki sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular:

H&E ile yapılan değerlendirme:

Ön çalışmada defekt oluşturduktan hemen sonra, aynı gün alınan örnekte telin geçtiği tarafda, kortikal kemikte defekt ve aynı bölgedeki kemik iliğinde defektli bölgeden kopan nekrotik kemik artıkları gözlemlendi. Daha sonraki haftalardaki bulgular için bu örnek başlangıç noktasını oluşturdu.

Grup A

Birinci hafta:

Birinci grupta sadece femoral korteks defekti oluşturulan femur ile aynı deneğin karşı femuru karşılaştırıldı. Bütün deneklerde Kishner telinin geçtiği bölgede kemik defekti saptanırken karşı femurda kortikal kemik ve kemik iliği tamamen normal gözlemlendi. Periostta ise bistrinin dokunduğu bölgede hafif reaktif değişiklikler görüldü.

Defektli bölgeyi dolduran yeni kemik woven (keçemsi) tipte olup, encondral kemikleşme hiçbir denekte saptanmadı. Defekt alanında her olguda sıfırıncı günde saptanmış olan nekrotik kemik farklı şiddetlerde mevcuttu. Ayrıca bazı alanlarda hematoma ve neovaskularizasyon gözlemlendi.

İkinci hafta:

Defektli taraf femur örneklerinde iyileşme bölgesinde hematoma artık izlenmezken, nekrotik kemik miktarı da azalmıştı. Woven tip kemikleşme yanında bazı olgularda lameller tip kemikleşme saptandı.

Karşı taraf femur örnekleri yine normal sınırlar içinde bulundu.

Üçüncü hafta:

Iyileşmenin yirmibirinci gününde, ikinci haftanın sonunda olduğu gibi iyileşme bölgesinde hematoma izlenmezken, bir miktar nekrotik kemik görülmeye devam etti. Lameller tipdeki kemik ise belirginleşerek, bazı deneklerde defektli bölgeyi tam olarak kapamıştı. Resim 2'de sırasıyla Grup A,B ve C'de defekt bölgesindeki 1., 2. ve 3. haftalardaki morfolojik değişiklikler gösterilmiştir.

Semikantitatif olarak değerlendirilen osteosit, osteoblast, osteoklast ve mezenkimal hücre proliferasyonlarının sonuçları Tablo 1'de bildirilmiştir

Grup B

Bu grupta izlenen en belirgin özellik; iyileşme bölgesine komşu perostta saptanan perost reaksiyonu oldu. Her üç haftada da Grup A'dan daha şiddetli ve encondral tip reaksiyonu da içeren subperiostal kemikleşmenin derecelerine göre dağılımları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Birinci hafta:

Bu grupta defekt bölgesinde Grup A'ya göre daha belirgin yeni kemik oluşumu saptandı. Hematom ve nekrotik kemik varlığı açısından Grup A ile bir farklılık gözlemlenmedi.

İkinci hafta:

Hematom ve nekrotik kemik kaybolurken, Grup A'dan farklı olarak kemikleşme woven tipte olmaya devam etti.

Üçüncü hafta:

Lameller Tip kemik Grup A'ya oranla daha az miktarda olmak üzere bazı olgularda saptandı. Tablo 3'de haftalara göre farklı hücre miktarlarının dağılımı gösterilmiştir

Grup C

Bu gruptaki ratların BMP verilen femurlarının karşı tarafları da kortikal defekt içeriyordu, ancak oluşan hematoma içine Grup A gibi SF injekte edilmişti. Buna karşılık morfolojik olarak incelendiği zaman, yeni oluşan kemik miktarı ve periost reaksiyonu açısından, bulguların daha çok aynı ratın BMP uygulanan karşı femur kesitlerine benzerlik gösterdiği görüldü.

Birinci hafta:

Hematoma ve nekrotik kemik izlendi. Yeni kemik oluşumu woven tipinde ve Grup A'ya göre daha belirgindi.

İkinci hafta:

Hematoma kayboldu, nekrotik kemik azaldı. Lameller kemik sadece bir olguda izlendi.

Üçüncü hafta:

Lameller tipde kemik oranı arttı.

Hücre tiplerine göre semikantitatif değerlendirme Tablo 4'de gösterilmiştir.

İlk oluşturulan gruplardan bazılarında gelişen istenmeyen kontrolsüz kırıklar da ayrıca endokondral kemikleşme sırasındaki protein ekspresyonlarının gözlenmesine olanak verdi. Bu düzensiz kırık içeren deneklerin hepsinde, kortikal defektli deneklerin hiçbirinde izlenmeyen kondrosit hücre differansiyasyonu ile karakterli endokondral kemikleşme belirgin düzeyde mevcuttu.

İmmünohistokimyasal değerlendirme :

BMP :

Grup A'da anti-BMP ile özellikle yeni kemikleşme bölgesindeki osteoblastlarda (birinci haftanın sonunda daha şiddetli olmak üzere) sitoplazmik pozitiflik izlendi. Periosit, osteosit ve osteoklast hücrelerinde ise yine birinci haftada daha belirgin olan pozitiflik vardı (Resim 4a,b).

Grup B'de ekzojen BMP nin de etkisiyle osteoblast, osteosit ve periositlerde daha şiddetli ve ikinci, hatta üçüncü hafta sonuna kadar süren pozitiflik görüldü. Grup B, A ile karşılaştırıldığı zaman periosit, osteoblast, osteosit, mezenkimal hücrelerdeki ekspresyon artışı anlamlı farklılık gösteriyordu (Tablo 4).

Grup C'de BMP ekspresyonu Grup A ile karşılaştırıldığı zaman periost, osteoblast ve osteositlerdeki ekspresyonu anlamlı bir şekilde azalmış olarak saptandı.

PTH:

Grup A'da anti-PTH ile periosit, osteoblast, osteosit ve mezenkimal hücrelerde hafif pozitiflik izlendi. Birinci hafta ekspresyonları göreceli olarak biraz daha yüksekti.

Grup B'de periosit, osteoblast, osteosit ve osteoklast hücrelerindeki PTH ekspresyonu daha belirgindi (Resim 4c,d)

Grup C'de PTH ekspresyonu açısından Grup A ile önemli bir farklılık izlenmedi.

β -katenin:

Grup A'da anti- β -katenin ile periostta ve osteositte zayıf, osteoblastlarda ilk haftada daha belirgin olmak üzere daha kuvvetli membranöz boyanma izlendi. β -kateninin nükleer ekspresyonu ise grup B'de periost reaksiyonu içindeki kondrositlerde ve defektli bölgeye komşu normal osteositlerde, hemen hemen her grupta saptandı (Resim 4e,f) .

Grup B'de osteoblast, osteosit ve osteoklastlarda membranöz boyanma şiddeti Grup A'ya göre anlamlı bir şekilde artmıştı. (Tablo 4). Periositte hafif artış olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Grup C'de hücrelerdeki β -katenin ekspresyonu A'ya göre hafif artsa da istatistiksel olarak çok anlamlı bulunmadı.

Tcf-4:

Grup A: periositlerde daha az olmak üzere, osteoblastlarda pozitif izlendi. İkinci haftada Grup B'de periosit, osteoblast ve osteositlerde anti Tcf-4 ekspresyonu anlamlı düzeyde artış gösterdi. Grup C'de osteosit ekspresyonu daha az saptandı. Diğer hücrelerdeki Tcf-4 ekspresyonu A ve C Grupları arasında bir farklılık göstermedi.

İmmünohistokimyasal olarak çalışılan bütün proteinlerin haftalara ve hücelere göre dağılımı Resim 3a ve 3b 'de grafiklerle gösterilmiştir. Ayrıca Tablo 5'de bütün proteinlerin gruplar arasındaki farklılıklarının istatistiksel değerleri verilmiştir.

Tartışma:

Son yıllarda yeni kemik oluşumu ve kırık iyileşmesi sırasında, BMP ve Wnt sinyal yolu proteinleri ile ilgili moleküler çalışmalar hız kazanmıştır. Bu proteinlerle ilgili moleküler düzeydeki etkileşimler henüz in vivo çalışmalarda ispat edilememektedir. Biz bu çalışmada femurun korteksinde tek taraflı defekt oluşturarak kontrollü kırık iyileşme modeli sağlayarak BMP'nin farklı hücre tiplerindeki etkisini invivo koşullarda da kanıtladık. Lokal uyguladığımız rhBMP proteini pıhtı içine, hiçbir taşıyıcı madde kullanılmaksızın verilmesine rağmen etkisini gösterdi. Rekombinant human BMP'yi 30 µg lokal olarak, pıhtı içine uygulamanın etkili bir yöntem olduğunu; BMP verdiğimiz femurlarda daha kuvvetli immunohistokimyasal BMP ekspresyonu saptamakla doğruladık. Deneklerin hepsinde iyileşme, Einhorn'un tarif ettiği gibi kortikal ve periostal dokuların katkısı ile intramembranöz tip kemikleşme şeklinde gerçekleşti. Enkondral tip kemikleşmeyi ise sadece çalışmadan çıkarılan, istenmeyen kırık oluşan deneklerde izledik.

Kırık iyileşmesi açısından gruplar karşılaştırıldığı zaman en önemli farklılık defekli bölgenin komşuluğundaki periost reaksiyonunda oldu: Grup A'da bu reaksiyon direkt intramembranöz kemikleşme şeklinde iken Grup B ve C'de daha çok miktarda ve enkondral kemikleşme odakları da içeren tipde bir periost reaksiyonuydu ($p=0,0001$). Bu bulgu eksternal BMP'nin periost kökenli öncül hücrelerin kondroid differansiyasyonunda rolü olduğunu göstermektedir. Burada daha çok ilgimizi çeken periost reaksiyonunun sadece BMP enjeksiyonu uygulanan tarafta değil (Grup B), aynı ratın karşı femurunda da artması (Grup C) oldu. Lokal uyguladığımız 30mikrolitre dozdaki rekombinant human BMP proteinin sistemik yoldan karşı femur kırık iyileşmesini de etkilemesi, klinik uygulamalarda BMP'nin istenmeyen etkilerinin de olabileceğini düşündürdü. Bu konuda Tsiridis ve ark.larının yaptığı bir çalışma dışında benzer bir bulguya rastlamadık (TSIRIDIS, 2006). Bu araştırmacılar, kırık iyileşmesinde BMP ve PTH tedavisini birlikte uyguladıkları için sistemik bulguyu daha çok PTH etkisi ile açıklamışlardı. Egermann ve ark.ları da benzer şekilde lokal verilen BMP'nin sistemik olarak yeniden şekillenmeyi (remodelling) engellediği sonucuna varmışlardır (EGERMANN, 2006). Bizim çalışmamızda ise Grup A'da, üçüncü haftanın sonunda periost reaksiyonu azalmıştı. Buna karşılık tek taraflı BMP enjeksiyonu yapılan ratların her iki taraf femurlarında da (Grup B ve C), üç hafta sonra hala periost reaksiyonu belirgindi. Belki bu bulgu Egermann ve ark.larının ortaya attığı; eksternal BMP'nin güçlü kallus oluşumu sağlarken yeniden şekillenmeyi (remodelling) engellediği hipotezini desteklemektedir. Bu konuda daha kesin sonuçlar elde etmek için BMP'nin üç haftadan daha uzun süre sonra etkilerini araştırmak gerekmektedir.

Bizim bu çalışmayı yapmaktaki temel amacımız; eksternal uygulanan BMP sonucunda kırık bölgesindeki farklı hücrelerde, BMP-2, PTH, β -katenin ve Tcf-4 ekspresyonlarındaki değişiklikleri gözlemlemektir. İmmunohistokimyasal olarak BMP-2 ekspresyonu; osteoblast, osteosit ve periositlerde intrasitoplazmik ve/veya nükleer olmak üzere birinci ve ikinci haftalarda grup B'de A'ya göre anlamlı şekilde artmıştı. Böylece eksternal rhBMP-2 uygulamanın hücrelerdeki BMP-2 ekspresyonunda da artış yaptığını kanıtlamış olduk. Bu arada bu ekspresyonun ilk iki hafta sonunda özellikle osteoblast ve osteositlerde artması ve osteoklastlarda görülmemesi ilgi çekici bir bulgu idi. Buna karşılık anti-PTH ekspresyonu birinci hafta sonunda, periosit, osteoblast, osteosit ve mezenkimal hücrelere ek olarak osteoklastlarda da artmıştı. BMP-2 verilen grupta, hücrelerde PTH ekspresyonunda anlamlı artış olması BMP'nin paratiroid hormonunu da indüklediğini göstermektedir. Bu sonuç diğer araştırmacıların BMP ve PTH arasında sinerji olduğu yönündeki düşüncelerini desteklemektedir (TSIRIDIS, 2006, TOBIMATSU, 2006). Ayrıca son yıllarda tek başına PTH'un aralıklı dozlarla kemik iyileşmesini uyardığını gösteren çalışmalar da artmıştır

(NAKAZAWAA, 2005). Bu moleküler çalışmaların sonucu; her iki proteinin de birbirlerini pozitif yönde indükleyebildiğini göstermektedir.

Anti-B katenin ekspresyonu ise, Grup B'deki periosit ve osteosit hücrelerinde membranöz artış şeklinde iken, periost reaksiyonu içindeki kondrositlerde ve osteoid dokudaki osteoblastlarda nükleer lokalizasyondaydı. Bu bulgu moleküler çalışmalarda ortaya konan BMP-2 ile Wnt/ β -katenin sinyal yolunun ilişkisini *in vivo* koşullarda da kanıtlamaktadır (MBALAVIELE, 2005, DONG, 2005). Diğer taraftan β -kateninin PTH ve ilişkili proteinlerle de etkileşimi moleküler çalışmalarda gösterilmektedir (TOBIMATSU, 2006). β -kateninin nükleer ekspresyon artışı, özellikle birinci haftada, hem Grup B, hem de C'de görülmesi; sistemik BMP-2 etkisinin yine sistemik Wnt sinyal yolu ile olduğunu düşündürmektedir. Eksternal uyguladığımız rhBMP proteini, encondral kemikleşmede kondrosit differansiyasyonunu nükleer β -katenin artışı ile uyarmakta idi. Hatta Tcf-4 de β -katenine paralel olarak kondrositlerde nükleer ekspresyon gösteriyordu. Tcf-4 ekspresyonu aynı zamanda; Grup B'deki periosit, osteoblast, osteosit ve mezenkimal hücrelerde farklı zamanlarda anlamlı artışlar gösterdi. Bu immünohistokimyasal çalışmada söz konusu proteinlerin farklı hücrelerde, farklı haftalarda, farklı derecelerde ekspresyon olduklarını gözlemledik (Resim 3). Literatürde bizimkine benzer immünohistokimyasal sadece bir çalışmaya rastladığımız için, bu sonuçları fazla karşılaştırma olanağı bulamadık. (KLOEN, 2003). Söz konusu araştırmacılar insan kırık dokusunda çalışmış ve osteoblastlarda değişik BMP antikoru ile pozitiflik göstermelerine karşın, kondrositlerde bu bulgunun değişiklik gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Kondrosit hücre kültürü çalışmalarında; BMP-2' nin total nükleer B-katenin miktarındaki artışını ve membranöz ekspresyonunda azalmayı gösteren moleküler çalışmalar mevcuttur (ZHANG, 2004, MODARRESI, 2005). Diğer taraftan normal iskelet gelişimi sırasındaki kondrogenesis indüksiyonu ile kırık iyileşmesi sırasındaki osteogenesis ve kondrogenesis uyarılmasındaki β -katenin rolünün farklı olabileceği ile ilgili çelişkili görüşler yayımlanmaktadır. (CHEN, 2007, DAY, 2005). Biz defekt bölgesinde hiçbir grupta kondroid differansiyasyon, dolayısıyla kondrosit izlemedik. Ancak defekt bölgesine komşu periost reaksiyonu içinde kondrosit içeren kondroid differansiyasyon odakları mevcuttu. Buna karşılık çalışma gruplarından çıkardığımız, istenmeyen kırık gelişen olgularda kırık bölgesinde bol miktarda kondroid differansiyasyon mevcuttu.

Özet olarak bundan sonraki araştırmalar, rhBMP'nin farklı kırık modellerine göre etkisinin değişip değişmediği sorusunun yanı sıra, lokal rhBMP'nin ne tür sistemik etkileri vardır sorusuna da yanıt aramalıdır.

REFERANSLAR

1. Bostrom, MPG. , Camacho, NP. Potential Role of Bone Morphogenetic Proteins in Fracture Healing, *Clin. Orthop.* 355S: 274-282, (1998).
2. Chen Y, Whetstone HC, Youn A, Nadesan P, Chow EC, Lin AC, Alman BA. Beta-catenin signaling pathway is crucial for bone morphogenetic protein 2 to induce new bone formation. *J Biol Chem.* Jan 5;282(1):526-33. (2007)
3. Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. Wnt/B-Catenin Signaling in Mesenchymal Progenitors Controls Osteoblast and Chondrocyte Differentiation during Vertebrate Skeletogenesis. *Developmental Cell*, Vol. 8, 739–750, May, (2005).
4. Dong, Y., Drissi H., Chen M., Chen D., Zuscik MJ., Schwarz EM., O’Kefee RJ., Wnt-Mediated Regulation of Chondrocyte Maturation: Modulation by TGF- β , *J Cell Biochem* 95:1057–1068, (2005).
5. Egermann M, Lill CA, Griesbeck K, Evans CH, Robbins PD, Schneider E, Baltzer AW. Effect of BMP-2 gene transfer on bone healing in sheep. *Gene Therapy* . 13, 1290–1299, (2006).
6. Einhorn TA, Trippel SB: Growth Factor Treatment of Fractures. Instructional Course Lectures, American Academy of Orthopaedic Surgeons, Vol 46:483-486, (1997).
7. Einhorn, TA, The Science of Fracture Healing , *J Orthop Trauma.* Nov-Dec;19(10 Suppl):S4-6., (2005)
8. Fischer L., Haas AR, Tauna RS. N-Cadherin and β -Catenin involvement in BMP-2 induction of mesenchymal chondrogenesis, *Signal Transduction*, 1-2, 66278, (2001).
9. Holzer G., Majeska RJ., Lundy MW., Hartke JR., Einhorn, TA. Parathyroid Hormone Enhances Fracture Healing: A Preliminary Report; *Clin Orthop*, 366:258-263, (1999).
10. Kloen P, Paola M, Richmond J, Perino G, Helfet DL, Goumans MJ. BMP signaling components are expressed in human fracture callus. *Bone* 33, 362-371. (2003)
11. Kulkarni NH, Halladay DL, Miles RR et al. Effects of parathyroid hormone on Wnt signaling pathway in bone. *J Cell Biochem.* (6): 1178-90, (2005).
12. Marsell R, Jonsson KB, Cho TJ, Einhorn TA, Ohlsson C, Schipani E. Mice expressing a constitutively active PTH/PTHrP receptor in osteoblasts show reduced callus size but normal callus morphology during fracture healing. *Acta Orthop.* Feb;78(1):39-45, (2007).
13. Mbalaviele G, Sheikh S, Stains JP, Salazar VS, Cheng SL, Chen D, Civitelli R. β -Catenin and BMP-2 Synergize to Promote Osteoblast Differentiation and New Bone Formation. *Journal of Cellular Biochemistry* 94:403–418 (2005).

14. Meyer RA. , Meyer MH., Tenholder M. , Wondracek S. , Wasserman R. , Garges P, Gene Expression in Older Rats with Delayed Union of Femoral Fractures, *JBJS* 85A:1243-1254, (2003).
15. Modarresi R, Lafond T, Roman-Blas JA, Danielson KD, Tuan RS, Seghatoleslam MR. N-Cadherin Mediated Distribution of b-Catenin Alters MAP Kinase and BMP-2 Signaling on Chondrogenesis-Related Gene Expression. *J. Cell. Biochem.* 95: 53–63, 2005.
16. Nakazawaa T, Nakajimaa A, Shiomib K, Moriyaa H, Einhornc TA, Yamazakia M. Effects of low-dose, intermittent treatment with recombinant human parathyroid hormone (1–34) on chondrogenesis in a model of experimental fracture healing. *Bone* 37, 711–719 (2005).
17. Nunamaker, DM: Experimental Models of Fracture Repair, *Clin. Orthop.* 355S: 56-65,1998.
18. Ohnakaa K., Tanabea M., Kawatea H., Nawatab H., Takayanagia R. Glucocorticoid suppresses the canonical Wnt signal in cultured human osteoblasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329: 177–181, (2005).
19. Opran AV., Wozney J., Csimma C., Lilly L., Riedel GE. Clinical Evaluation of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 , *Clin. Orthop.*395: 110–120, (2002).
20. Tobimatsu T, Kaji H, Sowa H, Naito J, Canaff J, Hendy GN, Sugimoto T, Chihara K. Parathyroid Hormone Increases b-Catenin Levels through Smad3 in Mouse Osteoblastic Cells. *Endocrinology* 147(5):2583–2590, (2006).
21. Tsiridis E, Morgan EF, Bancroft JM, Song M, Kain M, Gerstenfeld L, Einhorn TA, Bouxsein ML, Tornetta M. Effects of OP-1 and PTH in a New Experimental Model for the Study of Metaphyseal Bone Healing. *J Gene Therapy.* 2006 Sep;13(17):1290-9. (2006).
22. Urist MR, DeLange RJ, Finerman GA. Bone and cell differentiation and growth factors. *Science*; 220: 680–6, (1983).
23. Westendorf JJ, Kahler RA. , Schroeder TM. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases *Gene* 341: 19–39, (2004)
24. Zhang WV, Stott NS. BMP-2-Modulated Chondrogenic Differentiation In Vitro Involves Down-Regulation of Membrane-Bound Beta-Catenin. *Cell Communication and Adhesion*, 11: 89–102, (2004).
25. Zhong N, Gersch RP, Hadjiargyrou M. Wnt signaling activation during bone regeneration and the role of Dishevelled in chondrocyte proliferation and differentiation. *Bone* 39 5–16, (2006).

14. Meyer RA. , Meyer MH., Tenholder M. , Wondracek S. , Wasserman R. , Garges P, Gene Expression in Older Rats with Delayed Union of Femoral Fractures, *JBJS* 85A:1243-1254, (2003).
15. Modarresi R, Lafond T, Roman-Blas JA, Danielson KD, Tuan RS, Seghatoleslam MR. N-Cadherin Mediated Distribution of b-Catenin Alters MAP Kinase and BMP-2 Signaling on Chondrogenesis-Related Gene Expression. *J. Cell. Biochem.* 95: 53–63, 2005.
16. Nakazawaa T, Nakajimaa A, Shiomib K, Moriyaa H, Einhornc TA, Yamazakia M. Effects of low-dose, intermittent treatment with recombinant human parathyroid hormone (1–34) on chondrogenesis in a model of experimental fracture healing. *Bone* 37, 711–719 (2005).
17. Nunamaker, DM: Experimental Models of Fracture Repair, *Clin. Orthop.* 355S: 56–65,1998.
18. Ohnaka K., Tanabe M., Kawate H., Nawata H., Takayanagia R. Glucocorticoid suppresses the canonical Wnt signal in cultured human osteoblasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329: 177–181, (2005).
19. Opran AV., Wozney J., Csimma C., Lilly L., Riedel GE. Clinical Evaluation of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 , *Clin. Orthop.*395: 110–120, (2002).
20. Tobimatsu T, Kaji H, Sowa H, Naito J, Canaff J, Hendy GN, Sugimoto T, Chihara K. Parathyroid Hormone Increases b-Catenin Levels through Smad3 in Mouse Osteoblastic Cells. *Endocrinology* 147(5):2583–2590, (2006).
21. Tsiridis E, Morgan EF, Bancroft JM, Song M, Kain M, Gerstenfeld L, Einhorn TA, Bouxsein ML, Tornetta M. Effects of OP-1 and PTH in a New Experimental Model for the Study of Metaphyseal Bone Healing. *J Gene Therapy.* 2006 Sep;13(17):1290-9. (2006).
22. Urist MR, DeLange RJ, Finerman GA. Bone and cell differentiation and growth factors. *Science*; 220: 680–6, (1983).
23. Westendorf JJ, Kahler RA. , Schroeder TM. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases *Gene* 341: 19–39, (2004)
24. Zhang WV, Stott NS. BMP-2-Modulated Chondrogenic Differentiation In Vitro Involves Down-Regulation of Membrane-Bound Beta-Catenin. *Cell Communication and Adhesion*, 11: 89–102, (2004).
25. Zhong N, Gersch RP, Hadjiargyrou M. Wnt signaling activation during bone regeneration and the role of Dishevelled in chondrocyte proliferation and differentiation. *Bone* 39 5–16, (2006).

Tablo 1: Grup A'daki defekt bölgesindeki hücre artışlarının H&E boyamalı kesitlerde semikantitatif değerlendirme sonuçları

Defekt alanı içindeki hücre Tipi	Derecesi	Hafta		
		Birinci (n=7)	İkinci (n=7)	Üçüncü (n=7)
Osteoblast	+	0/7	6/7	5/7
	++	7/7	1/7	2/7
Osteosit	+	0/7	4/7	5/7
	++	7/7	3/7	2/7
Osteoklast	yok	4/7	4/7	3/7
	+	3/7	2/7	3/7
	++	0/	1/7	1/7
Mezenkimal Hücre	yok	3/7	6/7	6/7
	+	1/7	1/7	0/7
	++	3/7	0/7	0/7
	+++	1/7	0/7	1/7

Tablo 2: Gruplar arasında subperiostal kemikleşmenin derecelerine göre dağılımları

Periosit reaksiyonu	Derecesi	Hafta		
		Birinci (n=7)	İkinci (n=7)	Üçüncü (n=7)
Grup A	+	1/7	7/7	7/7
	++	2/7	0/7	0/7
	+++	4/7	0/7	0/7
Grup B	++++	4/7	0/7	0/7
	+++++	3/7	0/7	0/7
	++++++	0/7	7/7	7/7
Grup C	+	0/7	0/7	1/7
	++++	1/7	0/7	0/7
	+++++	4/7	0/7	0/7
	++++++	2/7	7/7	6/7

Tablo 3: Grup B'de defekt bölgesindeki hücre artışlarının H&E boyamalı kesitlerde semikantitatif değerlendirme sonuçları

Hücre Tipi	Derecesi	Hafta		
		Birinci (n=7)	İkinci (n=7)	Üçüncü (n=7)
Osteoblast	+	0/7	0/7	2/7
	++	0/7	2/7	4/7
	+++	7/7	5/7	1/7
Osteosit	+	0/7	0/7	3/7
	++	4/7	7/7	4/7
	+++	3/7	0/7	0/7
Osteoklast	yok	0/7	1/7	3/7
	+	7/7	3/7	3/7
	++	0/7	2/7	1/7
	+++	0/7	1/7	0/7
Mezenkimal Hücre	yok	1/7	4/7	7/7
	+	0/7	1/7	1/7
	++	3/7	0/7	0/7
	+++	2/7	0/7	0/7

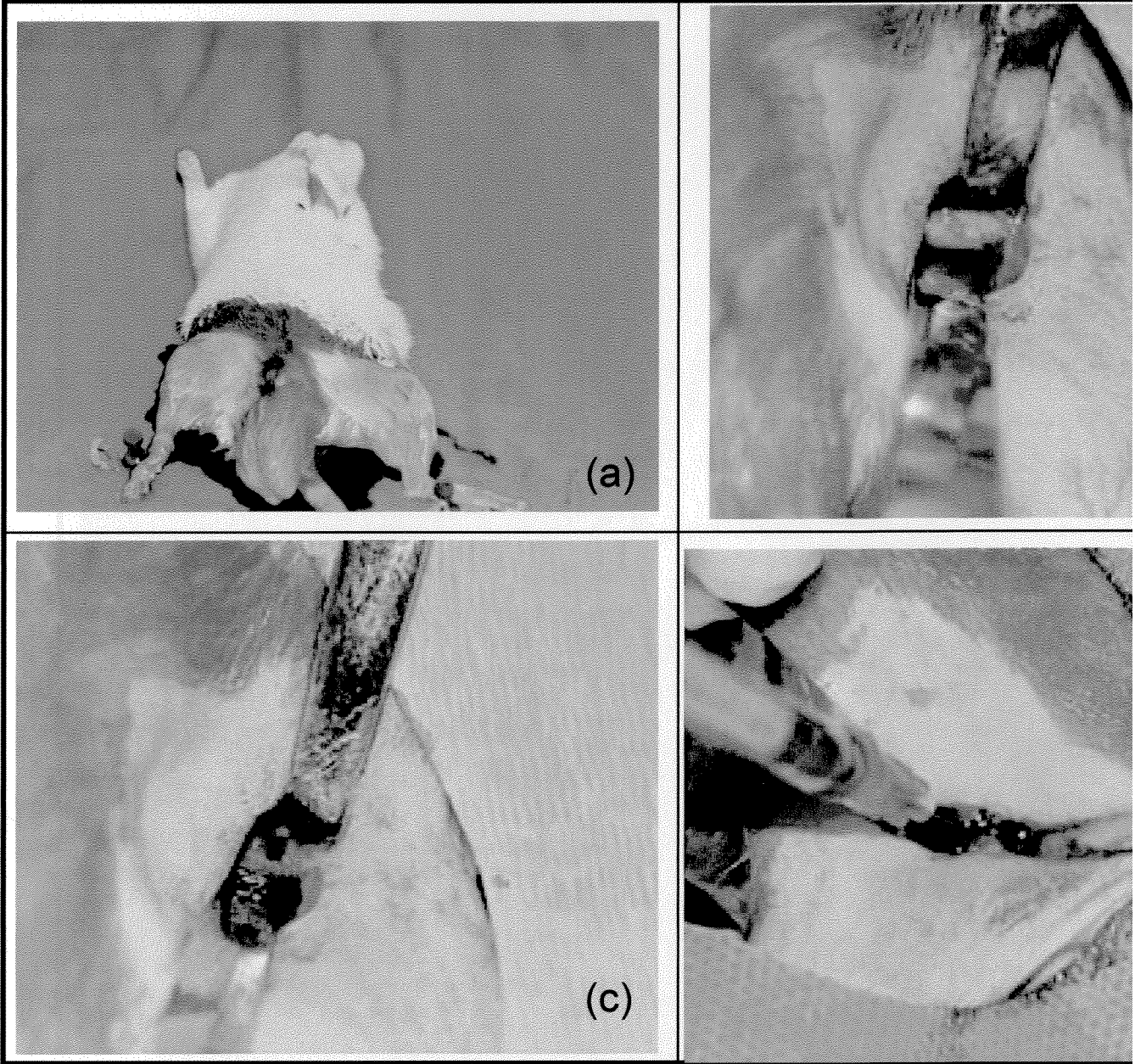
Tablo 4: Grup C'de defekt bölgesindeki hücre artışlarının H&E boyamalı kesitlerde semikantitatif değerlendirme sonuçları

Hücre Tipi	Derecesi	Hafta		
		Birinci (n=7)	İkinci (n=7)	Üçüncü (n=7)
Osteoblast	+	0/7	0/7	7/7
	++	5/7	4/7	0/7
	+++	2/7	3/7	0/7
Osteosit	+	4/7	0/7	0/7
	++	3/7	7/7	7/7
Osteoklast	yok	0/7	0/7	1/7
	+	2/7	2/7	6/7
	++	5/7	5/7	0/7
Mezenkimal Hücre	yok	1/7	3/7	7/7
	+	1/7	4/7	0/7
	++	3/7	0/7	0/7
	++	2/7	0/7	0/7

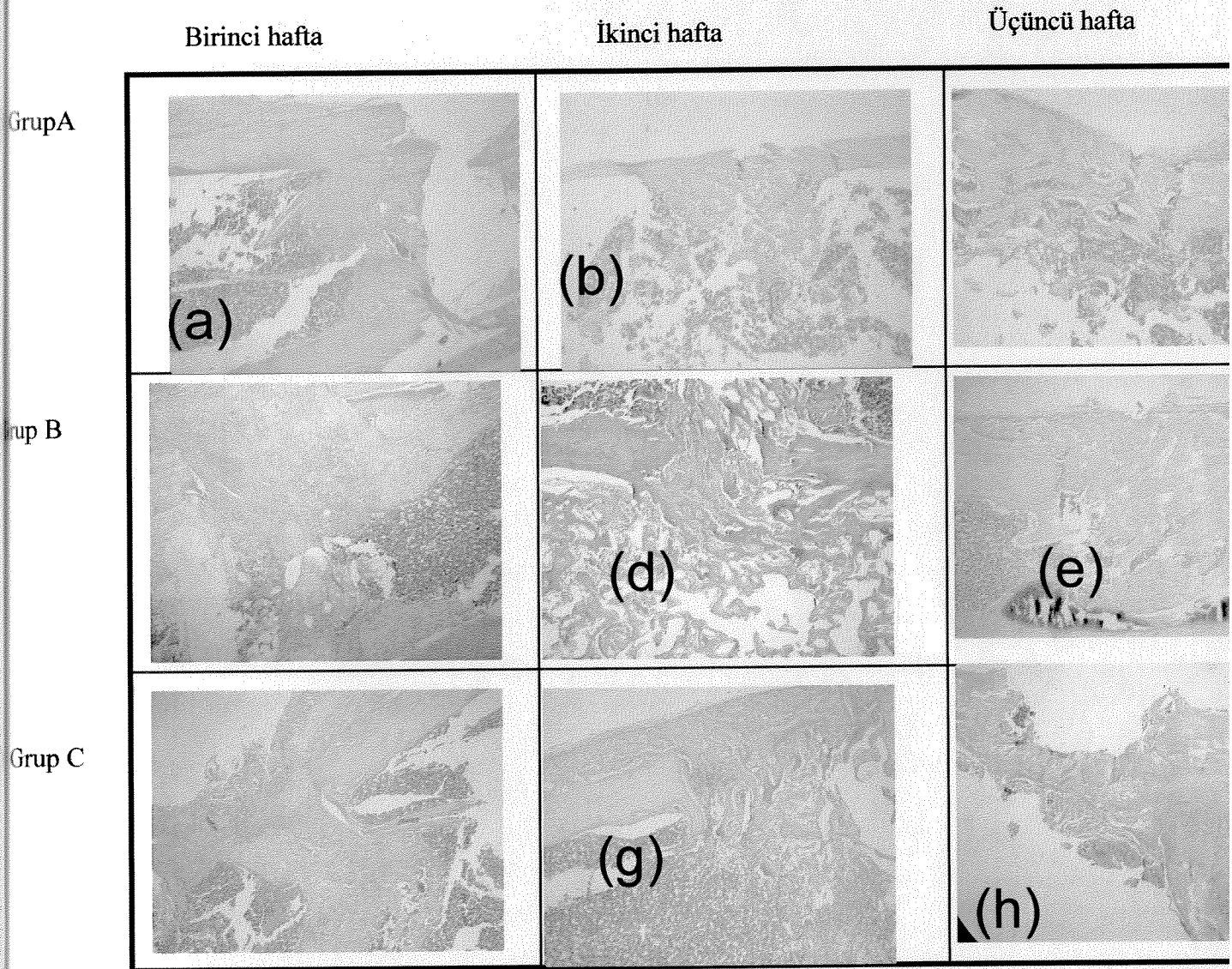
Tablo 5: Grup A ile B arasındaki BMP, PTH, β -katenin ve TCF ekspresyonlarının istatistiksel karşılaştırma sonuçları.

Hücre Tipi	Antikor Ekspresyonu	Hafta		
		Birinci	İkinci	Üçüncü
Periosit	BMP	p=0,006	p=0,03	p=0,06
	PTH	p=0,019	p=0,002	p=0,02
	β -katenin	p>0,05	p=0,06	p>0,05
	TCF	p>0,05	p=0,000	p>0,05
Osteoblast	BMP	p=0,06	p=0,004	p>0,05
	PTH	p=0,01	p=0,01	p=0,007
	β -katenin	p>0,05	p=0,06	p>0,05
	TCF	p=0,01	p=0,007	p>0,05
Osteosit	BMP	p=0,037	p=0,023	p>0,05
	PTH	p=0,006	p=0,007	p>0,05
	β -katenin	p>0,05	p=0,025	p=0,0001
	TCF	p=0,008	p=0,001	p>0,05
Osteoklast	BMP	p>0,05	p>0,05	p=0,04
	PTH	p=0,028	p>0,05	p>0,05
	β -katenin	p>0,05	p>0,05	p=0,046
	TCF	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Mezenkimal Hücre	BMP	p=0,003	p>0,05	p>0,05
	PTH	p>0,05	p>0,05	p>0,05
	β -katenin	p>0,05	p>0,05	p>0,05
	TCF	p=0,017	p>0,05	p>0,05

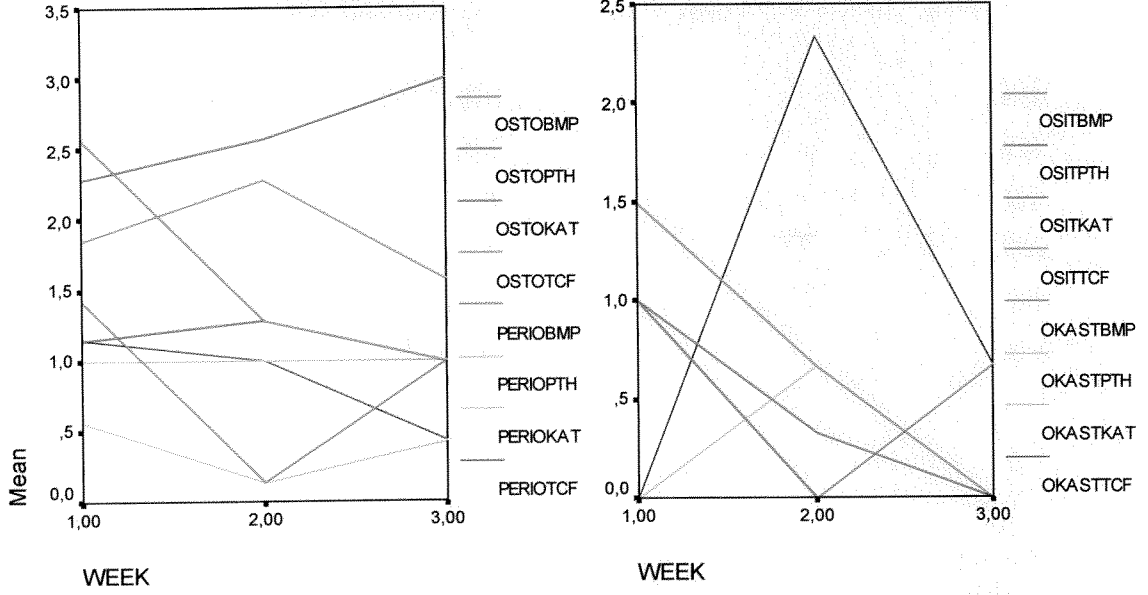
Resim 1: (a): Grup B ve C 'yi oluşturan bir denekte ameliyat öncesi hazırlık.
(b): Femur eksplorasyonu, (c): Kishner teli ile oluşturulmuş defekt ve (d): defekt içine BMP-2 injeksiyonu.



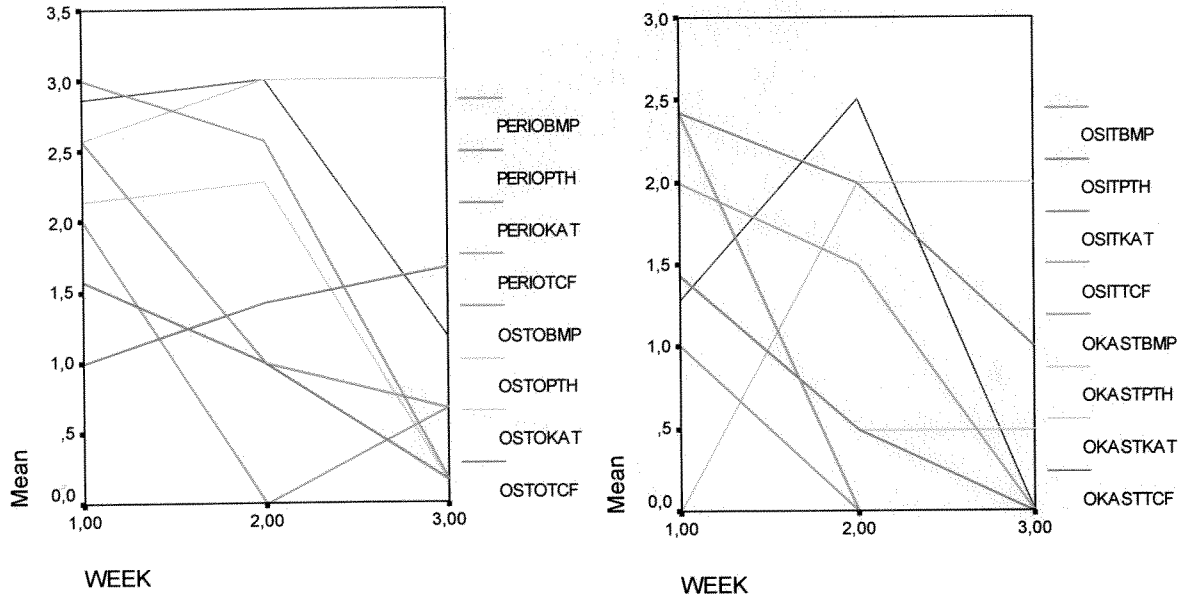
Resim 2: Grup A,B ve C'de, 1., 2. ve 3. hafta sonunda, femoral defekt bölgesinde ve komşu periostta görülen morfolojik değişiklikler



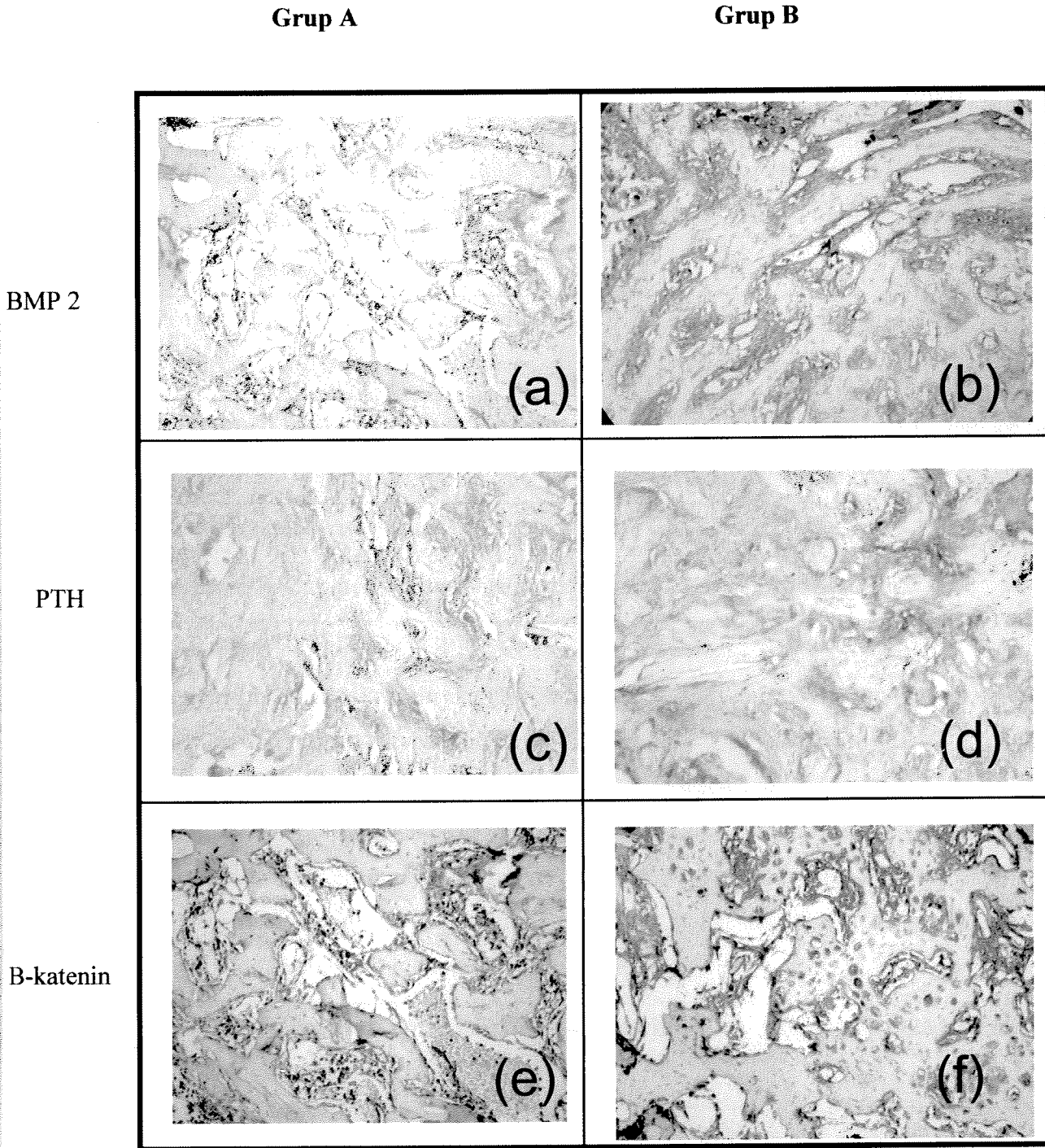
Resim 3a: Grup A'daki osteoblast(osto), periosit (perio), osteosit(osit) ve osteoklast (okast) hücrelerinde BMP, PTH, Beta-katenin ve TCF düzeylerinin haftalara göre dağılımı.



Resim 3b: Grup B'deki osteoblast(osto), periosit (perio), osteosit(osit) ve osteoklast (okast) hücrelerinde BMP, PTH, Beta-katenin ve TCF düzeylerinin haftalara göre dağılımı.



Resim 4: Grup B’de artmış sitoplazmik ve/veya nükleer Anti-BMP-2, PTH/PTHrp, beta-katenin ekspresyonları



TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 105S437(SBAG-3244)
Proje Başlığı: Ratlarda geliştirilen femoral kortekste defekt modelinde Wnt/beta catenin sinyal yolu proteinlerinin Bone morfojenik protein (BMP) ve paratiroid hormonu ile ilişkisi
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Doç.Dr. Neşe Demirkan, Doç. Dr. Fahir Demirkan, Arş. Gör. Ayşegül Aksoy, Arş Gör. Mehmet Özdemir
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kınıklı kampüsü, Patoloji AD. Morfoloji Binası, Kat 1, Kınıklı Denizli
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK SBAG
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01.05.2006- 01.05.2007
Öz (en çok 70 kelime) Bu çalışmada BMP-2'nin kallusu dokusunda BMP-2, PTH, beta-katenin ve Tcf-4 ekspresyonlarını in vivo olarak araştırmayı amaçladık. Lokal rhBMP-2 uygulanan ratların, ilginç olarak sistemik etki ile karşı femurlarında da periost reaksiyonu artışı oldu. Yine rhBMP-2 uygulanan grupta, osteoklastlar da dahil bütün kallusu oluşturan hücrelerde PTH ekspresyon artışı ve periostal kemikleşme bölgesindeki kondrositlerde nükleer beta-katenin artışı görüldü. Böylece rhBMP-2'nin PTH ve Wnt sinyal yolu ile pozitif yönde etkileştiğini dokuda göstermiş olduk.
Anahtar Kelimeler: Bone morfojenik protein, kırık iyileşmesi, beta-katenin, Wnt sinyal yolu, paratiroid hormonu
Projeden Yapılan Yayınlar: Avrupa kongrelerine bildiri ve A grubu dergiye yayın olarak hazırlanma aşamasındadır. Yanıt alındığı zaman TÜBİTAK'a hemen bildirilecektir.