

1993

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Ortopedi ve Travmatoloji

Anabilim Dalı

KRONİK BÖBREK HASTALIĞI OLAN RATLARDA
TERİPARATİD KULLANIMININ
KIRIK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Elfida AJDİN

ANKARA, 2018



1993

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Ortopedi ve Travmatoloji

Anabilim Dalı

KRONİK BÖBREK HASTALIĞI OLAN RATLARDA
TERİPARATİD KULLANIMININ
KIRIK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Elfida AJDİN

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Salih BEYAZ

ANKARA, 2018

TEŞEKKÜR

Henüz dört yaşındaki bir çocukken ‘ameliyat doktoru’ (cerrah) olacağımı söylediğimde bana o gün itibariyle başlayan ve bir gün olsun azalmayan inancı ve desteği olan Babam’a,

En zor günlerimde bile ‘Sen yaparsın, bir adım daha’ diyen Annem’e,

Bana benden daha çok inanan ablam, ağabeylerim ve tüm aile bireylerime,

Başkent Üniversitesi Kurucu Rektörü ve Dünya Organ Nakli Derneği Başkanı değerli hocam sayın Prof. Dr. Mehmet Haberal’a,

Uzmanlık eğitimim süresince her daim bilgi, beceri ve tecrübesiyle yanımda olan değerli Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. İ. Cengiz Tuncay’a,

Eğitime başladığım ilk günden itibaren nezaket ve hoşgörülle eğitici kimliğinin nasıl olması gerektiğini bana öğreten çok değerli hocam Prof. Dr. İlhami Kuru’ya,

Meslek hayatımdaki temel taşları yerine oturtmamdaki katkılarından dolayı saygıdeğer hocam Prof. Dr. Murat Ali Hersekli’ye,

Hekimlik hayatım boyunca ‘O olsa nasıl yapardı?’ diye düşünmemin temeli olacak değerli hocam Prof. Dr. Gürkan Özkoç’a,

‘Bir ortopedist her şeyi yapabilmeli?’ ilkesiyle hareket etmeyi öğreten değerli hocam Prof. Dr. Metin Özalay’a,

Akademik alanda nasıl başarılı olunur ve başarıdaki adımlar nelerdir diye düşünmek yerine başarı için adım atmak gerektiğini öğreten, ayrıca tezimin şekillenmesindeki katkılarından dolayı tez danışmanın Yrd. Doç. Dr. Salih Beyaz’a,

Hekimlik mesleğindeki çalışma azmi ve sevgisiyle yorulmak bilmeyen ve bunu aşılایan değerli hocam Prof. Dr. Hüseyin Demirörs’e,

Yaptığımız mesleği diğerlerinden farklı kılan şeyin uğraşımızın ‘insan’ olduğunu ve davranışımızı bunun belirleyeceğini öğreten değerli hocam Prof. Dr. Rahmi Can Akgün’e,

Akademik çalışma hayatımdaki emeklerinden dolayı değerli hocalarım Doç. Dr. B. Murat Çınar, Doç. Dr. Orçun Şahin, Yrd. Doç. Dr. Ümit Ö. Güler’e,

Tezimin radyolojik incelemesindeki katkılarından dolayı Prof. Dr. Muhteşem Ağıldere ve Prof. Dr. Ayşin Pourbagher’e,

Tezimin deneysel kısmında bana yardımcı olan Yunus Süygün, Ali Şahinci ve Herdem Kaygusuz’a

Tezimin histopatolojik incelemeler bölümüneki katkılarından dolayı Doç. Dr. E. Tuba Canpolat'a,

Tezimin biyokimyasal incelemelerindeki katkılarından dolayı Öğr. Gör. Dr. Kerem Metin'e,

Tezimin biyoistatistik değerlendirmesinde yardımcı olan Sn. Çağla Sarıtürk'e,

Deney hayvanları laboratuvarındaki çalışmalarım süresince bana destek olan Vet.

Hkm. Evren hanım, Tkn. Adem ve Tkn. Sezai beylere,

Başkent Üniversitesi Ankara, Adana, Alanya ve İstanbul Hastaneleri bünyesinde çalışan değerli meslektaşlarım, hemşire, personel ve tüm sağlık çalışanlarına sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Saygılarımla

Dr. Elfida AJDİN



ÖZET

Kronik böbrek hastalığı (KBH), tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de görülme sıklığı gittikçe artan önemli bir sağlık sorunudur. Kronik böbrek hastalığında başlatılan neden ne olursa olsun en önemli sorun son dönem böbrek yetmezliğine ilerleme ve böbrek fonksiyon kaybına bağlı gelişen komplikasyonlar sağlık sektöründe diyaliz ihtiyacının artmasının yanı sıra daha birçok alanda sorunlar ortaya çıkarmakta ve tedavi gereksinimi artmaktadır.

Kronik böbrek hastalığında ileri evrelerde ve yetmezlik gelişen hastalarda özellikle kemik mineral metabolizması bozuklukları Ortopedi ve Travmatoloji kliniğinde önemli komplikasyonlarla karşımıza çıkmaktadır. KBH olan hastalarda kemiklerdeki kemik mineralizasyonunun azalmasına ve kemik yapımı ve yıkımındaki dengenin bozulmasına bağlı olarak dinamik kemik hastalığı, tekrarlayan kemik kırıkları, kırık kaynamasında komplikasyonlar gibi birçok sorun uzun uğraşlar gerektirmekte ve eş zamanlı olarak gerek hasta gerekse hekim açısından zaman ve maddi kayba neden olmaktadır. Bu çalışma ülkemizde ve özellikle merkezimizde takip edilen çok sayıda KBH'lı hasta göz önünde bulundurularak, yukarıda saydığımız sorunlara bağlı gelişebilecek komplikasyonlar sonucu oluşan kayıpları en aza indirmek amacıyla yürütülmüştür.

Bu amaçla çalışmamızda 32 adet Sprague- Dawley cinsi erkek sıçan, Grup I, Grup II, Grup III ve Grup IV olmak üzere ve her grupta eşit sayıda (8 adet) sıçan olacak şekilde dört gruba ayrıldı. Grup II ve Grup IV'teki sıçanlara KBH oluşturmak amacıyla 5/6 nefrektomi uygulandı. Gruplardaki tüm sıçanlara tur motoru ile sağ femur diafiz kırığı oluşturuldu. Kırık oluşturulmasını takiben tüm sıçanların sağ femurlarına k-telleri ile intramedüller fiksasyon uygulandı. Grup I'deki sıçanlar osteotomi oluşturulan kontrol grubu olarak, Grup II'deki sıçanlar KBH oluşturularak ilaç tedavisi almadan takip edilecek KBH'lı kontrol grubu olarak belirlendi. Grup III sıçanlar KBH oluşturulmayan ancak ilaç kullanılarak kırık iyileşmesi takip edilen, Grup IV sıçanlar ise KBH oluşturularak ilaç kullanılacak çalışmadaki temel grup olarak belirlendi.

Sıçanların KBH tanısı ve takibi amacıyla 4 haftalık süreler ile ağırlık ölçümü ve 0.gün, 4.hafta ve 8.haftalarda (sakrifikasyon öncesinde) kan hemoglobin, üre ve kreatinin seviyeleri ölçüldü. Kemik iyileşmesi ve kallus oluşumu; radyolojik olarak direkt grafî, histopatolojik olarak ise Hematoksilen Eosin boyama ile değerlendirildi.

Morfolojik olarak kallus dokusu miktarı ve kemiğin düzgün iyileşme bulguları sırası ile: Grup III> Grup I> Grup IV> Grup II olarak bulundu. Kemik iyileşmesinin takibi radyolojik olarak direk garfilerde kallus dokusunun ölçümü ile rakamsal olarak belirlendi. Medüller kanalın en dış kısmından başlanarak kortikal kısım ve kallusun en dış kısmına kadar olan kalınlık ölçüldü. Kallus kalınlıkları rakamsal olarak belirlendi. Kallusun en dış noktasına olan kalınlıklarının ölçülmesi sonucu ortalama kallus kalınlıkları; Grup I (1.538 ± 0.7763), Grup II (0.738 ± 0.6781), Grup III (1.775 ± 0.7126), Grup IV (1.500 ± 0.3464) olarak ölçüldü. Kemik iyileşmesi skorlama sistemi sonuçları ile ölçülen kallus kalınlıklarının karşılaştırılmasında; skorlama sistemi ile kallus kalınlıkları arasında anlamlı korelasyon gözlemlendi. 0. gün, 4. hafta, ve 8.haftada alınan kan örneklerinde BUN, kreatinin seviyelerinde yükselme ve hemoglobin seviyelerindeki düşme anlamlı bulundu. Histopatolojik değerlendirmede kemik dokunun iyileşme skorlaması (Allen skorlaması) sonuçları Grup I (3.38 ± 1.302), Grup II (3.88 ± 1.458), Grup III (2.5 ± 1.609), Grup IV (3.0 ± 1.927) olarak bulundu.

Bu çalışmada KBH'nın kemik iyileşmesi üzerindeki olumsuz etkilerinin PTH analogu olan ve düşük dozlarda ve aralıklı uygulamalarda anabolik etkisi olduğu birçok makalede gösterilmiş olan Teriparatid tedavisi araştırıldı. Radyolojik olarak kırık kaynamasında kallus oluşumunu arttırdığı gözlenirken, yapılan birçok çalışmanın aksine histopatolojik olarak kaynama açısından anlamlı fark olmadığı ancak yine histopatolojik olarak kırık iyileşmesi sırasında kemik dokudaki nekrozu önlemede anlamlı fark olduğu gözlemlendi.

Çalışmamızda KBH'lı hastalarda radyolojik olarak kallus kalınlığının ilaç kullanılmayan gruba göre daha fazla olacağı ve iyileşme esnasında oluşabilecek nekrozun ve bu nekrozun uzun dönemde kırık iyileşmesinde oluşturacağı olumsuz etkilerinin önlenebileceği kanaatindeyiz.

Anahtar kelimeler: Teriparatid, Kırık iyileşmesi, Kronik Böbrek Hastalığı

ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) is an important health problem that has been seen to increase globally and in our country as well. No matter the cause leading to chronic kidney disease, most importantly is its progression to late stage kidney failure and complications due to kidney dysfunction. As a result, apart from the need for dialysis in the health sector, problems in quite a number of areas ensue and also an increased need for treatment.

Patients who have advanced chronic kidney disease and kidney failure develop especially disorders of bone and mineral metabolism presenting with important complications to the Orthopaedic Surgery and Traumatology clinic. Decreased bone mineralization and impaired balance between bone formation and bone resorption in CKD patients lead to many problems like adynamic bone disease, recurrent bone fractures and complications in bone union that require long term management and at the same time costs both the patient and the doctor time and money. This study has been carried out taking into consideration the number of CKD patients in our country and especially in our clinic and with the aim of reducing to the minimum the complications that would ensue as a result of the above mentioned problems. In this study 32 Sprague-Dawley male rats were divided into 4 groups each with equal numbers (8 rats). Single session 5/6 nephrectomy model described by Seth et al. was applied to the rats in Group II and Group IV with the aim of inducing CKD. Right femur diaphysis fracture was created using a rotating bar in all the rats in all the groups. Intramedullary fixation of the right femur with k-wire was then done on all the rats after the fracture. The rats in Group I were designated to be a control group with osteotomies and the rats in Group II were designated to be a CKD control group with induced CKD and would be followed up with no treatment. Group III rats would not be induced to have CKD however they would be administered medicine to treat fractures, whereas Group IV rats were the main group that would be induced to develop CKD and administered medicine.

To be able to diagnose and follow up CKD induced in the rats, weight measurements were taken for a period of 4 weeks and hemoglobin, urea and creatinin levels measured at the beginning, on the 4th week and on the 8th week (before sacrifice). Bone healing and callus formation was evaluated radiologically using x-ray and histopathologically using hematoxylin and eosin staining.

Morphologically the amount of callus tissue and signs of bone healing were determined to be in this order; Grup III> Grup I> Grup IV> Grup II. Bone healing was monitored radiologically using x-ray whereas measurement of callus tissue was done numerically.

The thickness from medullary canal's outer most part to the cortical part and the outer most part of callus was measured. The thickness of callus was determined numerically. Callus thickness that was measured upto the outer most point was determined and the average thicknesses was as follows; Grup I (1.538 ± 0.7763), Grup II (0.738 ± 0.6781), Grup III (1.775 ± 0.7126), Grup IV (1.500 ± 0.3464). The results of bone healing scoring system were compared to measurements of callus thickness and a significant correlation observed. Blood samples taken at the beginning, on the 4th week and 8th week showed levels of BUN and creatinin to have significantly increased and levels of hemoglobin to have significantly decreased. With histopathologic evaluation the results of bone healing scoring (Allen scoring system) were as follows; Grup I (3.38 ± 1.302), Grup II (3.88 ± 1.458), Grup III (2.5 ± 1.609), Grup IV (3.0 ± 1.927).

In this study the therapeutic effect of Teriparatide on bone healing affected by CKD has been investigated. Teriparatide is a PTH analogue that has been shown in a number of articles to have an anabolic effect when applied intermittent. Radiologically it has been observed that callus formation increases in fracture union whereas unlike many studies carried out, there was no significant difference in terms of fracture union histopathologically. However there was a significant difference in the prevention of necrosis in bone tissue while the fracture is healing.

In our study radiologically callus thickness in CKD patients would be greater compared to the group that medicine was not used and we believe that necrosis that occurs during healing and its long term impact on the healing of fracture would be prevented.

Key words: Teriparatide, Fracture healing, Chronic Kidney Disease

İÇİNDEKİLER

Teşekkür.....	i
Özet.....	iii
İngilizce Özet.....	v
İçindekiler Dizini.....	vii
Kısaltmalar.....	ix
1. Giriş ve Amaç.....	1
2. Genel Bilgiler.....	1
2.1 Kemik ve Böbrek ilişkisi.....	1
2.2 KBH olanlarda kemik değişiklikleri.....	2
2.2.1 KBH ve kemik metabolizma bozuklukları.....	2
2.2.2 KBH deneysel modelleri.....	3
2.2.3 Cerrahi yöntemler.....	3
2.3 Adinamik kemik hastalığı (Düşük Döngülü Renal Osteodistrofi).....	5
2.4 Paratiroid Hormon.....	5
2.4.1 Paratiroid hormon sentezi ve salgılanmasının regülasyonu.....	6
2.4.2 Paratiroid hormonun böbreklere etkisi.....	8
2.4.3 Paratiroid hormonun kemik üzerine etkisi.....	8
2.4.4 Osteositik osteoliz.....	9
2.5 Teriparatid.....	10
3. Gereç ve Yöntem.....	11
3.1 Deney hayvanlarının gruplandırılması.....	11
3.2 Deney hayvanlarının bakımı.....	11
3.3 Deneyde kullanılan malzemeler.....	12
3.4 Kırık modeli ve cerrahi işlemler.....	12
3.5 Kronik böbrek hastalığı oluşturulması (5/6 Nefrektomi).....	13
3.5.1 Cerrahi kırık modelinin oluşturulması.....	15
3.6 Deney kronolojisi.....	18
3.7 Makroskopik değerlendirme.....	19
3.8 Radyolojik değerlendirme.....	20
3.9 Laboratuvar değerlendirme.....	20
3.9.1 Kronik böbrek hastalığı doğrulanması.....	20
3.10 Histopatolojik değerlendirme.....	21

3.11 Kemik dokunun mikroskopik değerlendirilmesi	21
3.12 Biyoistatistiksel değerlendirme	23
4. Bulgular	24
4.1 Ağırlık değerlendirilmesi	24
4.2 Kemiklerin makroskopik bulguları	25
4.3 Kemik iyileşmesinin radyolojik bulguları	26
4.4 Kan örnekleri test sonuçları.....	27
4.5 Histopatolojik değerlendirme bulguları	28
4.6 Kemik iyileşmesinin histopatolojik değerlendirilmesi.....	29
5. Tartışma.....	30
6. Sonuç	33
7. Kaynaklar	34

KISALTMALAR

<i>ALP:</i>	Alkalen fosfataz
<i>ark.:</i>	Arkadaşları
<i>BUN:</i>	Kan üre azotu (Blood Urea Nitrogen)
<i>Ca</i>	Kalsiyum
<i>dk:</i>	Dakika
<i>EDTA:</i>	Etilendiamin tetraasetik asit
<i>H&E:</i>	Hematoksilen ve eosin
<i>Hgb:</i>	Hemoglobin
<i>PTH:</i>	Parathormon
<i>i.p:</i>	Periton içerisine
<i>i.v:</i>	Damar içerisine
<i>K:</i>	Potasyum
<i>KBH:</i>	Kronik böbrek hastalığı
<i>ml:</i>	Mililitre
<i>Na:</i>	Sodyum
<i>P:</i>	Fosfor
<i>PTH:</i>	Parathormon
<i>vb.:</i>	ve benzeri

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Bu çalışmada kemik ve böbrek ilişkisini saptamak, böbreğin kemik için olan önemini anlatmak, kronik böbrek hastalığı olan hastalarda kemik değişikliklerini tanımlamak, dinamik kemik hastalığı oluşumunu ve aşamalarını anlatmak, Parathormonun yapımını ve analoglarını tanımlamak, PTH'nun kemik kaynaması üzerine etkisinin anlatılması, deneysel olarak kronik böbrek hastalığı olan sıçanlarda kemik kırıkları sonrasında Teriparatid kullanımının kırık iyileşmesi üzerine etkisinin araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 KEMİK VE BÖBREK İLİŞKİSİ

Kemik doku destek ve koruma görevi yanı sıra metabolik açıdan da kalsiyum için depo görevi görür. Kemik doku %70'i inorganik, %22'si organik matriks ve %8'i su moleküllerinden oluşur. Darbelere en dayanıklı ikinci dokudur ve hayati organları korur. İçeriğindeki hidroksiapatit kristalleri, osteositler, osteoklastlar, osteoblastlar, hematopoetik hücreler, kollajen lifler, kan damarları ve sinirler bulunan kemik doku hareket sisteminin en önemli destek dokusudur. Organizmaya mekanik destek ve dayanıklılık sağlamak, beyin ve diğer dokuları koruma görevi, hematopoez için uygun ortam sağlama gibi fonksiyonları da bulunmaktadır.

İskelet yapısında %80 oranında kortikal, %20 oranında trabeküler kemik bulunur. Kortikal kemik mekanik ve koruyucu fonksiyon üstlenirken, trabeküler kemik ise metabolik fonksiyondan sorumludur.

Kemik doku yapısal olarak inorganik tuzlar ve organik matriksten oluşmaktadır. Organik matriksin %90'lık kısmı tip 1 kollajenden, geri kalan kısmı osteokalsin, osteonektin, osteopontin, fibronektin, kemik sialoprotein II, BMP ve büyüme faktörleri gibi kollajen olmayan proteinlerden meydana gelir. Ayrıca kemik yapısında decorin, biglycan, lumican, osteoaderin ve seric proteinler gibi lösinden zengin proteoglikanlar bulunmaktadır.

Kemik dokunun inorganik kısmının büyük bölümü kalsiyum ve fosfat iyonlarından oluşmaktadır ancak yapısal olarak bikarbonat, sodyum, potasyum, sitrat, karbonat, florit, çinko, baryum ve stronsiyumda bulunmaktadır.

Kalsiyum ve fosfat iyonlarının birleşmesi ile kemiğe dayanıklılık ve esneklik kazandıran hidroksiapatit kristalleri ortaya çıkar. Kemik matriksi kompleks yapıdadır. Organize bir çerçeve şeklinde mekanik destek ve kemik hemostazında kritik rol oynar. Kemik kütlelerinde azalma olması durumunda kemik kırıkları ortaya çıkar.

2.2 KBH OLANLARDA KEMİK DEĞİŞİKLİKLERİ

2.2.1 Kronik böbrek hastalığı ve Kemik Metabolizma Bozuklukları

Böbrekler serum Ca^{+} , P, PTH, kalsitriol ve FGF-23 düzeylerini etkileyerek kemik ve mineral metabolizmasında önemli rol oynar. KBH erken evrelerinden itibaren kemik oluşumu, kemiğin yeniden düzelmesi ve büyümesinde ayrıca mineral metabolizmasını düzenlenmesinde sorunlar ortaya çıkabilmektedir. KBH olanlarda kemik ve mineral metabolizması bozuklukları Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) tarafından aşağıdaki sorunlardan en az birinin varlığı olarak tanımlanmaktadır. [1]

1. Ca, P, PTH veya D vitamini metabolizmasının bozuklukları
2. Kemik histolojisinde ve boy uzamasındaki sorunlar
3. Damarlar ya da diğer yumuşak dokularda kalsifikasyonlar

Eski adıyla Renal osteodistrofi, yeni tanımlanmış adıyla Kemik Metabolizma Bozuklukları(KMB) KBH olanlarda komplikasyon olarak ortaya çıkan kemik patolojilerinin tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Yüksek döngülü kemik hastalığı (osteitis fibrosa sistika, ikincil hiperparatiroidizm) serum PTH fazlalığına bağlı olarak ortaya çıkan ve sıklıkla tedavisiz KBH hastalarında görülen bir tablodur. Düşük döngülü kemik hastalığı (adinamik renal osteodistrofi) ise yoğun ve uzun süreli Ca ve D vitamini desteği alıp serum PTH'sı baskılanan KBH hastalarında görülen bir durumdur. [2]

Böbrekler 1α -hidroksilaz enzimi ile 25-hidroksi vitamin D₃'ün aktif hali olan kalsitriola dönüşmesinin sağlarlar. Kalsitriol, serum Ca düzeyini bağırsaklardan Ca emilimini artırarak düzenlemektedir.

KBH'a bağlı olarak böbrek kitlesinde azalma olur. Böylelikle kalsitriol sentezi azalır ve hipokalsemi gelişir.

Hipokalsemi PTH salınımını artırır ve PTH kemik matriksinden Ca ve P rezorpsiyonu ile regülasyon sağlamaya çalışır.

PTH'nun P atılımını sağlaması nedeni ile serum fosforu normal veya hafif düşük düzeyde kalır. GFH'nın düşmesini takiben idrarla P atılımı azalır ve serum P düzeyleri giderek artar. Bu nedenler hiperfosfatemi Evre IV ve V KBH aşamasına kadar görülmez. [3] Hiperfosfatemi PTH salınımını artırır ve 1 α -hidroksilaz aktivitesinin baskılar. Uzun süreli hipokalsemi, hiperfosfatemi ve düşük kalsitriol ikincil hiperparatiroidizme yol açar ve bu durum paratiroid bezinde hiperplaziye neden olur.

FGF-23 ikincil hiperparatiroidizm patogeneğinde rol alan ve fosfatürik etkiye sahip bir hormondur. FGF-23 böbreklerden P atılımını artırır ve kalsitriol sentezini baskılar. KBH evresi ilerledikçe serum FGF-23 düzeyleri artar, fakat GFH'da azalmaya bağlı olarak P atılımı gerçekleşemez. Artan FGF-23 düzeyleri kalsitriol sentezini baskılayarak PTH salınımını artırır ve ikincil hiperparatiroidizm gelişmesine neden olur. [4]

KBH kemik kitlesinde azalmaya neden olsa da erken evre KBH hastalarında kemik ve mineral bozukluklarına tanı konmasında anlamlı yararı bulunmamaktadır. Evre III ve IV KBH hastalarında klinik ve laboratuvar olarak kemik hastalığını düşündüren bulgular varsa direk grafi çekilmelidir. Evre V KBH olanlarda ise yılda bir kez direk grafi çekilmesi önerilmektedir. Ağır ikincil hiperparatiroidizm varlığında direkt grafide subperiosteal rezorpsiyon görülmesi tipiktir. KBH'na bağlı kemik hastalığı tanısında altın standart yöntem kemik biyopsidir.

2.2.2 Kronik böbrek hastalığı deneysel modelleri

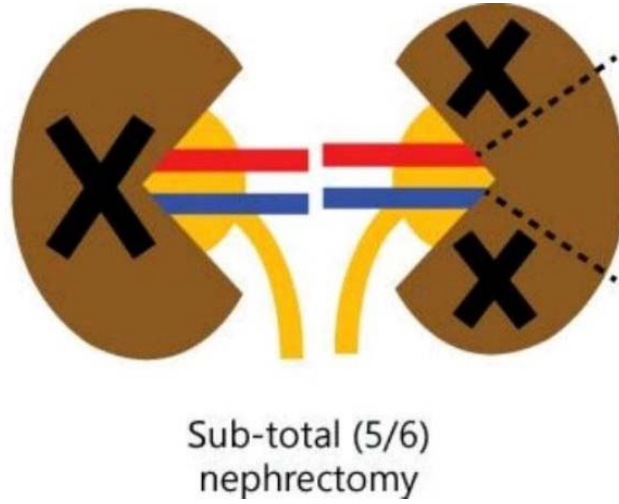
KBH patofizyolojisinin daha iyi anlaşılabilmesi ve KBH evrelerinde artışın önüne geçilmesi için deneysel modellere ihtiyaç vardır. Yapılacak olan deneysel modelin mevcut patoloji ve etiyojolojiye benzer olması önem taşımaktadır. Deneysel çalışmalarda kullanılan canlıların insanlara göre daha hızlı KBH geliştirmesi beklenmektedir. KBH çalışmalarında sıçan, fare ve tavşan kullanımı ön plandadır ancak uygulanacak yöntemler yüksek mortalite oranlarına sahiptir. KBH modelleri cerrahi ve farmakolojik olarak iki başlık altında incelenebilir.

2.2.3 Cerrahi yöntemler

Subtotal Nefrektomi: 5/6 Nefrektomi modeli olarak da bilinmektedir. İlerleyici böbrek yetmezliği modelleri arasında en sık kullanılan modellerden biridir.

Cerrahi teknik olarak ligasyon, ablasyon veya iki yöntem bir arada kullanılabilir.

Subtotal nefrektomi modeli ilk kez 1932 yılında Chauntin ve ark. tarafından tanımlanmıştır. [5] Yöntemin modern şekillenmesi 1988 yılında Gagnon ve ark.'nın tanımladığı fare modeli ile olmuştur. Bu yöntemde sol böbreğin üst ve alt polerinin ablasyonu veya ligasyonu uygulamasının ardından bir hafta sonra ikinci operasyonda sağ böbreğe nefrektomi uygulanmıştır. [6]



Şekil 2.1: Sağ nefrektomi ve sol 2/3 nefrektomi yöntemi

5/6 Nefrektomi modelinin avantajı kompansezyon mekanizmalarının devreye girmesi ile mortalitenin azaltılmasıdır. Laboratuvar olarak kan üre azotu cerrahi yapılan sıçanlarda kontrol grubuna göre 1,5- 4,8 kat artmış bulunurken %80 oranında glomeruloskleroz görülür. Seth ve ark bu tekniği modifiye ederek tek seansa indirmişlerdir. [7] Ayrıca olası komplikasyonların azaltılmasına yönelik inhale anestezi kullanmışlardır. [8]

2.3 ADINAMİK KEMİK HASTALIĞI (DÜŞÜK DÖNGÜLÜ RENAL OSTEODİSTROFİ)

Adinamik kemik hastalığı histopatolojik olarak, kemikte tüm hücresel aktivitelerde azalma ile karakterize düşük döngülü renal osteodistrofi formudur.

En sık nedenlerden biri Kronik Böbrek Hastalığıdır. Paratiroid bezin aşırı baskılanması (kalsiyum yükü, alüminyum, hipogonadizm, malnütrisyon) sonucu oluşur. Adinamik kemik hastalığı paratiroid hormonun düşük seviyesi ile karakterizedir. Hem osteoblast hem osteoklast seviyesi azalmıştır. Azalmış kemik formasyonu ve düşük kemik kitlesiyle sonuçlanır.

Tanımda altın standart kemik biyopsisidir ve düşük döngü, normal veya yüksek mineralizasyon, düşük kemik volümü ile karakterizedir. Spesifik radyolojik bulgusu bulunmamaktadır.

Düşük PTH düzeyi adinamik kemik hastalığında kırık için bağımsız bir risk faktörüdür.

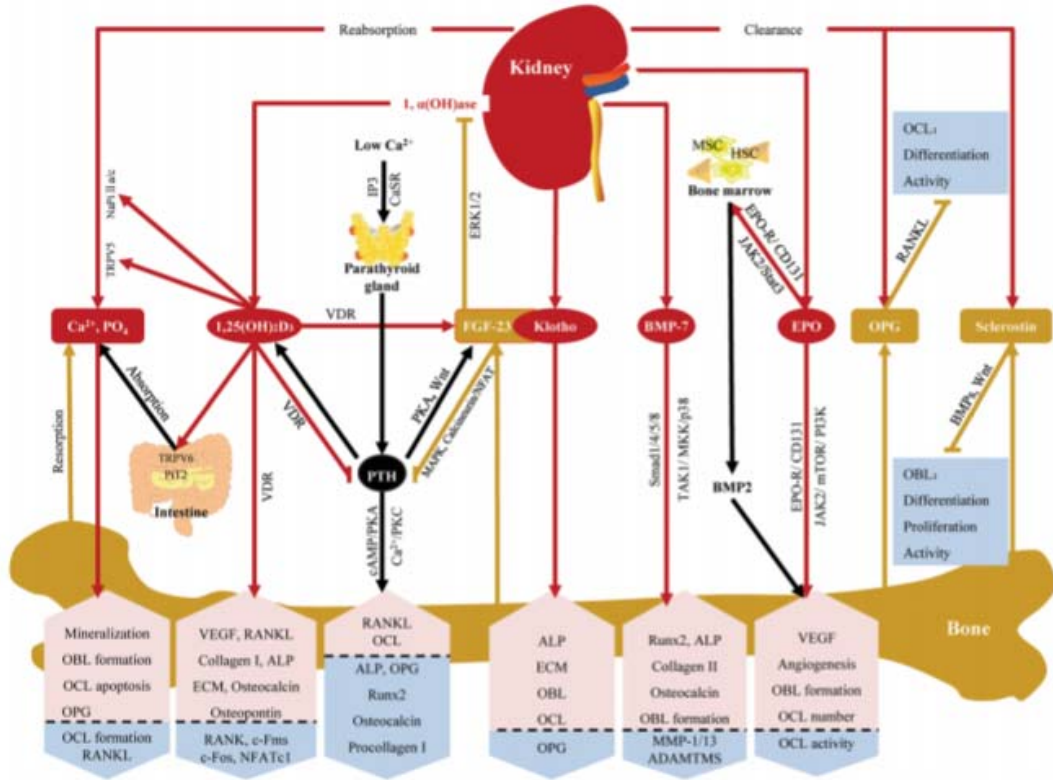
2.4 PARATİROİD HORMON (PARATHORMON-PTH)

Paratiroid hormon (PTH) kalsiyum dengesindeki temel regülatördür. Kemik metabolizması üzerine anabolik etkileri olduğu bilinmektedir. Yüksek PTH düzeyleri osteoklastları aktive ederken, aralıklı ve düşük dozlardaki konsantrasyonu osteoblastik aktiviteyi artırır. Son yıllardaki hayvan deneyi çalışmaları düşük dozlarda PTH uygulaması hem kortikal hem kansellöz kemikte kemik yoğunluğunu arttırmasının yanı sıra kırık iyileşmesinde kallus dokusunun mekanik dayanıklılığını ve volümünü arttırdığını göstermiştir. [9]

Parathormon (PTH) kalsiyum homeostazının hızlı kontrolünde barsaklar, böbrek ve kemik üzerindeki koordine etkisi ile kalsiyumun ekstrasellüler sıvıya akışını hızlandırarak kan kalsiyum düzeyini yükseltir. PTH şef hücreler tarafından prepro-PTH (115 aminoasitli bir protein) olarak endoplazmik retikuluma gönderilir. 25 amino asidin, molekülün amino terminalinden ayrılması ile pro-PTH ortaya çıkar. Molekülün amino terminalinden 6 amino asidin ayrılması son ürün olan PTH hücre tarafından salgılanır. PTH 84 amino asitli bir peptid olup 9500Da ağırlığındadır. Dolaşımında 2-3 dakika gibi kısa bir yarılanma ömrü içinde amino terminali (1-34 amino asitler) ve karboksi terminali olarak parçalanır. PTH hormon, böbrek ve kemik hücreleri fibroblastlar, kondrositler, damar düz kasları, adipositler ve plasental trofoblastlar olan hedef hücrelerde spesifik reseptörlere bağlanır.

2.4.1 Parathormon Sentezi ve Salgılanmasının Regülasyonu

PTH salgılanmasını kontrol eden bir tropik hormon yoktur. PTH sentezi ve salgılanması serum kalsiyum konsantrasyonu tarafından regüle edilir. Serum kalsiyum ve PTH arasında ters lineer bir ilişki vardır. Serum kalsiyumu fizyolojik "set point" olan 5.2 mg/dl (1.3 mM) altına indiğinde homeostazı sağlamak için, sentezi ve salgılanması artar. Serum kalsiyum konsantrasyonunda 0.1 mg/dl kadar küçük bir azalma PTH salgılanmasını 2 katına çıkarabilir. Serum kalsiyum konsantrasyonu 7 mg/dl altında iken PTH salgılanması en fazladır. Serum kalsiyumundaki değişikliklere cevaben PTH salgılanmasının değişmesi dakikalar içinde olur. Bu serum kalsiyum konsantrasyonunun kontrolü için vücudun son derece etkin bir "feedback" sistemidir. Hipokalsemi devam ederse, sentez kapasitesini arttırmak için, bezler hipertrofik ve hiperplazik olur. Mesela gebelikte annenin hücre dışı sıvı kalsiyum konsantrasyonunda çok hafif bir azalma olsa dahi paratiroid bezler büyür. Serum kalsiyumu 1.3 mM üzerine çıktığında PTH sentezi ve salgılanması süprese olur ve kalsiyum azalır. Ancak 11mg/dl üzerindeki kalsiyum konsantrasyonunda dahi düşük düzeyde, devamlı bir PTH salgılanması vardır ki, bu serum kalsiyumunun daha fazla yükselmesiyle süprese edilemez. Kalsiyum, PTH sentezi ve salgılanmasını regüle etmesi dışında PTH'un bez içinde parçalanmasını da değiştirir.



Şekil 2.2: PTH'nun sentezi, PTH-kemik-böbrek ilişkisi

Uzun süreli, yüksek kalsiyum konsantrasyonu PTH sentezini azaltması yanında PTH'un paratiroid hücresi içinde proteolizis ile parçalanmasını artırır. Hipokalsemi dahil bütün stimulan ajanların PTH salgılanmasını stimüle etmesi esas hücrelerde adenilat siklazın stimülasyonu ve hücre içinde siklik adeninmonofosfat (cAMP)'ın birikmesi ile sekretuar granüllerin ekzositozunun artması sonucu olur. cAMP'yi parçalayan fosfodiesteraz enziminin inhibisyonu da ekzositozu artırır. Paratiroid adenil siklazı, kalsiyum ile inhibe olur; hiperkalsemik durumlarda cAMP yapımı minimaldir. Alfa adrenerjik katekolaminler, PGF₂ alfa gibi PTH salgılanmasını inhibe eden ajanlar da paratiroid hücrelerinde cAMP düzeyini azaltırlar. Yani kalsiyum, PTH salgılanmasını kontrol eden başlıca faktör olmakla beraber cAMP de PTH salgılanmasında önemli bir hücrenel regülatördür. Beta adrenerjik katekolaminler, dopamin, sekretin, histamin ve PGE₂ adenil siklazı aktive ederek paratiroid hücrelerinde cAMP düzeyini artırır.

Diğer bir peptid "parathyroliberin" de sığır ve insan paratiroid hücrelerinde cAMP yapımının ve hormon salgılanmasının kuvvetli bir stimülatördür. 1,25(OH)₂D₃, paratiroidler üzerine direkt etkiyle prePTH mRNA'yı azaltarak PTH salgılanmasını inhibe eder. Serum magnezyum düzeyi PTH salgılanmasının regülasyonunda bir miktar fizyolojik rol oynayabilir ve bu kalsiyum etkisine benzerdir. Yani magnezyumdaki ani düşme PTH salgılanmasını direkt olarak artırır ve yükselmesini inhibe eder.

Uzun süreli ve çok düşük serum magnezyumu, PTH sentezine mani olur ve hipokalsemiye neden olabilir; zira magnezyum PTH sentezi için gereklidir.

Vinblastin ve kolşisin gibi bazı ilaçlar mikrotübüler fonksiyonu bozarak, PTH salgılanmasını inhibe eder. Kalsitonin, kortizol ve büyüme hormonu gibi çeşitli hormonlar PTH salgılanmasını indirekt olarak stimüle eder.

PTH'un 3 hedef organı kemik (osteoblastlar), böbrek ve barsaktır. Her biri üzerine etkisi hücre dışı sıvıda kalsiyum konsantrasyonunu arttırıcı yöndedir, böylece organizmayı hipokalsemiden korur. Plazma kalsiyum konsantrasyonunun regülasyonu 2 mekanizma ile olur:

- 1) PTH'un yokluğunda, kemiğin değişebilen kalsiyum havuzu ile plazma arasındaki serbest iyon değişimi hormonal etki altında değildir. Bu değişim sonucunda kan kalsiyumu 7 mg/dl civarında tutulur ve nadiren 6 mg/dl'nin altına iner. İskelet kalsiyumunun yaklaşık %1'i hücre dışı sıvı ile serbest değişimlidir.
- 2) PTH'un kemik üzerindeki resorbtif etkisi ile kalsiyum mobilizasyonu sonucu serum kalsiyumu 10 mg/dl civarında tutulur. PTH'un hücre dışı sıvıda kalsiyum arttırıcı etkisi 4 yolla olur:

1. İskelet kalsiyumunun plazmaya geçmesi
2. Kalsiyumun renal tübüler sıvıdan reabsorbsiyonunu arttırması
3. Renal 1-alfa hidroksilaz aktivitesini arttırması
4. Renal tübüler sıvıdan inorganik fosfatın reabsorbsiyonunu azaltması sonucu fosfat konsantrasyonunun azalması (bu etkisi kemikten fosfat rezorbsiyonunu arttırıcı etkisinden üstündür).

2.4.2 Parathormonun Böbreklere Etkisi

1. Kalsiyumun glomerüler filtrata ekstraksiyonunu arttırır. Böbreklerde PTH'nın major fizyolojik etkisi, Ca^{2+} reabsorbsiyonunu çoğaltmaktır. Fosfat sekresyonunu arttırır. PTH proksimal ve distal tübülüsleri etkileyerek Na^{+} bağımlı fosfat transportunu inhibe eder.
2. Bikarbonat klerensini arttırır; idrarın alkalileşmesi proksimal tübülüste bikarbonat reabsorbsiyonunun azalmasına sebep olur. Primer hiperparatiroidisi olan olgularda PTH aşırı salgılanması renal tübüler tip asidoza yol açar.
3. Serbest su klerensini arttırır, üriner akımı arttırır. Proksimal tübülüste Na^{+} reabsorbsiyonunun inhibisyonu, distal tübülüste Na^{+} yükünün artmasına neden olur. Bu noktada Na^{+} reabsorbsiyonu suya oranla daha fazladır, bu nedenle daha fazla serbest su idrara geçer.
4. Vitamin D 1α hidroksilaz aktivitesini arttırır.
5. Primer hiperparatiroidide PTH'nun renal etkileri, hiperkalsiüri, hipofosfatemi, hiperkloremik asidoz, poliüri, poldipsi ve cAMP'nin nefrojen fraksiyonunun artmış ekskresyonudur.

2.4.3 Parathormonun Kemik Üzerine Etkisi

Dolaşımdaki PTH düzeyine bağlı olarak bifaziktir; düşük konsantrasyonlarda anabolik etkiye sahiptir, yani organik matriksin oluşmasını ve minerallerin depozisyonunu artırır. Kemik kültürlerinde düşük dozlarda PTH, osteoblastların sayısını ve kollajen sentezini artırır. Nitekim PTH, bir osteoblastik enzim olan aktivitesi kemik formasyonu ile paralellik gösteren alkalen fosfatazın plazma düzeyini artırır. Sağlıklı normokalsemik kişilerde bulunan düzeylerde hem kemik formasyonunu hem rezorbsiyonunu stimüle eder ve formasyon, rezorbsiyona eşittir. PTH sekresyonunun artması halinde katabolik, rezorptif aktivite hakim olur.

Bu katabolik etki, yani kemikten kalsiyum ve fosfat rezorbsiyonuna neden olması 2 fazlıdır: ilk cevap 2-3 saat içinde gözlenen süratli fazdır ve başlıca etkisi osteositlerin aktivitesi sonucu kalsiyum rezorbsiyonuna yol açmasıdır ve osteositik osteolizis diye adlandırılır.

İkinci faz PTH'un daha uzun süreli yüksekliğinde, yaklaşık 12-24 saat sonra belirgin olan çok daha yavaş fazdır. Osteoklastların proliferasyonu ve aktivasyonu sonucu kemiğin osteoklastik rezorbsiyonuna bağlıdır ki hidrokisprolin ve diğer kollajen yıkım ürünlerinin idrarla atılımının artması bunun delilidir.

2.4.4 Osteositik osteolizis

Osteoblastlar ve osteositler osteoklastlara komşu küçük alanlar dışında, bütün kemik yüzeyine yayılan birbirine bağlı hücreler sistemi oluştururlar. Bütün kemik yapısında osteositten osteosite uzanan ve yüzeydeki osteositler ve osteoklastlarla da bağlantı sağlayan uzun, zar şeklinde uzantılar vardır. Bu yaygın sistem osteositik membran sistemi diye isimlendirilir ve kemiği hücre dışı sıvıdan ayıran bir membran oluşturur.

Osteositik membran ile kemik arasında kemik sıvısı diye adlandırılan az miktarda bir sıvı vardır. PTH osteoblast ve osteoklastların kemik sıvısındaki kalsiyuma permeabilitesini artırır, kalsiyum membran hücrelerine difüze olur ve osteositik membrandan hücreden sıvıya pompalanır, yani PTH kalsiyum pompasını aktive eder.

Osteositik pompa aşırı derecede aktive olduğu zaman kemik sıvısı kalsiyum düzeyi daha da azalır ve kemikten kalsiyum fosfat tuzları absorbe olur.

Bu etki osteolizis diye adlandırılır ki burada kemik matriksin absorpsiyonu söz konusu değildir. Kalsiyumun osteoblastlardan sıvıya aktif transportu 1,25(OH)2D3 tarafından da stimüle edilir ve bu, 1,25(OH)2D3'un PTH etkisini kolaylaştırmasını sağlar. Pompa inaktive olduğu zaman kemik sıvısı kalsiyum düzeyi yükselir ve kalsiyum fosfat tuzları tekrar matrikste çöker.

2.5 TERİPARATİD

Teriparatid kemik yapımını ve kemik yoğunluğunu arttırmak, aynı zamanda kemik fraktürlerini azaltmak için paratiroid hormonundan (PTH) elde edilmiştir. İnsan paratiroid hormonu (PTH 1-84) 84 amino asit bulunan zincirden oluşmaktadır. Teriparatid 2002 yılında Eli Lilly (Indianapolis, IN, ABD) tarafından geliştirilen, PTH'nin ilk 34 amino asitinden (PTH 1-34) oluşan bir rekombinant insan proteindir. Bu ajan, *Escherichia coli* türünden DNA rekombinant teknolojiyle üretilmiştir. PTH'nin ana görevi kemikte kalsiyum ve fosfat metabolizmasını düzenlemektir. Bu hormon osteoklastları uyararak kemik yapım mekanizmasını harekete geçirir ve bu uyarılma ile kemik yıkımı başlarken, diğer taraftan ise osteoblastik aktivite başlar. Bunun sonucu yeni kemik yapımı gerçekleşir. PTH'nin sürekli uyarılması ise ileri derecede kemik yıkımına sebep olup, bu yüzden aralıklı PTH salınımı ile kemik yapımı kontrol edilir. Dolaşımdaki serum kalsiyum düzeylerindeki herhangi bir azalma reseptörler aracılığıyla paratiroid bezini uyarır ve PTH salınımını artırır. PTH osteoklastik aktiviteyi uyarır, renal tubüllerde kalsiyum geri emilimini artırır, bu durum aynı zamanda renal fosfat kaybına da neden olur. Dolaylı yoldan ise 1-alfa-hidroksilaz enziminin uyarılmasıyla 1.25 dihidroksi vitamin D artışını sağlayıp bağırsakta kalsiyum ve fosfat emilimini artırır. Tüm bu etkiler PTH'nin kalsiyum metabolizmasının düzenlenmesinden sorumlu olduğunu kanıtlar niteliktedir.

Teriparatidin genel metabolizmasının ve atılımının tamamen açıklanamamasına karşın, PTH'nin periferal metabolizması karaciğerde spesifik olmayan enzimatik mekanizma ile gerçekleştiği ve bunu takiben atılımı ise böbrekler aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Teriparatid subkutan enjeksiyon ile daha yaygın absorbe edilir ve biyoyararlanım yaklaşık %95'tir.

Enjeksiyondan sonra serumdaki en yüksek konsantrasyon değerine otuzuncu dakikalarda ulaşır. Teriparatidin yarılanma ömrü yaklaşık 1 saat olup yaklaşık 3 saat sonra konsantrasyonunda önemli azalmalar olur. Teriparatid uygulandıktan sonra serum kalsiyum seviyesi ise yaklaşık 2 saat sonra artmaya başlar, altıncı saatten sonra seviye azalır, en düşük seviyeler ise 16-24. saatlerdedir. Teriparatid, son zamanlarda osteoporoz tedavisinde antirezorptif bir ajan olarak kullanılmaktadır. Ayrıca teriparatidin bifosfonatla ilişkili osteonekroz vakalarında kullanılması ile ilgili birkaç vakanın ve laboratuvar çalışmalarının bulunduğu bildirilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

DA 18/07 proje numaralı deneysel çalışma, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu, Hayvan Deneyle Yere Etik Kurulunun 19/02/2018 tarih ve 18/05 sayılı kararı ile uygun görülmüştür. Biyoistatistik ön değeriendirilme ile denek sayısı tespit edilmiş, ağırlıkları 350 ile 450 gr arasında değışen, 32 adet Sprague Dawley cinsi sağılıklı erkek sıçan kullanılmıştır. "Kronik böbrek hastalığı olan ratlarda teriparatid kullanımının kırık iyileşmesi üzerine etkisi" başlıklı araştırma Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Ünitesi Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.1 Deney hayvanlarının gruplandırılması

32 sıçan, Grup I (8), Grup II (8), Grup III (8), Grup IV (8) olmak üzere dört gruba ayrıldı. Grup II ve Grup IV sıçanlara cerrahi KBH modeli uyulandı. Gruplardaki tüm sıçanlara sağ femur osteotomisi uygulandı. Grup III ve Grup IV sıçanlara 4 hafta süre ile subkutan 20mikrogram/kg Teriparatid enjeksiyonu uygulandı.

Grup I : Sağılıklı kontrol grubu

Grup II : KBH'lı kontrol grubu

Grup III : Sağılıklı Teriparatid grubu

Grup IV : KBH'lı Teriparatid grubu

3.2 Deney hayvanlarının bakımı

Tüm deney hayvanlarına, 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık olacak şekilde standart oda koşulları sağılandı. Oda ısısı 18-20 °C arasında tutuldu. Sıçanlar yem ve musluk suyu ile beslendi. Operasyondan önce hayvanlara 24 saat açlık uygulandı. Hipotermi oluşmasını engellemek için sıçanlar ışık kaynağı altında ameliyat edildi ve uyanma esnasında da vücut ısıtması uygulamaya devam edildi.

Çalışmanın başladığı ilk günden itibaren 32 olan denek sayısı, her kafeste 4 denek olacak şekilde ve her kafeste hangi gruba ait oldukları yazacak şekilde düzenlendi.



Resim 3.1: Deney hayvanlarının bakımı

Gerek işlemler esnasında gerekse kafes temizlikleri esnasında oluşabilecek karışıklıkları önleme amacıyla tüm hayvanların kuyruklarına numaraları yazıldı. Düzenli olarak kontrol edilerek numaralarda silinme veya silikleşme durumunda yazı yenilendi.

Tüm hayvanlara cerrahi sonrası dönemde cilt altı 0.02 mg/kg fentanil ile analjezi uygulandı. Çalışma sonunda tüm sıçanlar, periton içine 150 mg/kg ketamin hidroklorür enjekte edilerek sakrifiye edildi.

3.3 Deneyde kullanılan malzemeler

Kullanılan farmakolojik ajanlar Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Farmakolojik Ajan	Uygulama Yolu	Uygulama Dozu- Amacı
Ketamin hidroklorür	Periton içi	40mg/kg – Anestezi
Ksilazin hidroklorür	Periton içi	5 mg/kg- Anestezi
Fentanil	Subkutan	0.02 mg/kg- Analjezik

Tablo 3.1: Anesteziye kullanılan farmakolojik maddeler.

3.4 Kırık modeli ve cerrahi işlemler

Deneyisel araştırma öncesinde Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun onayı ile 3 sıçan üzerinde pilot çalışma yapıldı. Deneyin tüm aşamaları böylelikle kaydedilerek temel çalışma için iyileştirmeler tasarlandı.

3.5 Kronik böbrek hastalığının oluşturulması (5/6 Nefrektomi)

Kronik böbrek hastalığı oluşturulmasında literatürde tarif edilen birçok yöntem incelenerek Seth ve ark. tarif ettiği 5/6 nefrektomi modeli pilot çalışmada test edilerek gerek tek cerrahi sonrası mortalite riskinin azaltılması gerekse kan üre-kreatin seviyelerindeki artışın, hemoglobin düzeyindeki azalmanın hızlı sonuç vermesi nedeniyle çalışmamızda uygun görüldü. Deneklere tek seanslı KBH modeli uygulandı.

Çalışmadaki Grup II, ve IV'teki sıçanlara tek seanslı 5/6 nefrektomi modeli uygulandı.[10] Cerrahi öncesi deney hayvanlarına, periton içine 40 mg/kg ketamin hidroklorür, 5 mg/kg ksilazin hidroklorür uygulanarak anestezi verildi.

Anestezi derinliği ekstremitte çekme yanıtı ile değerlendirildi. Anestezinin idamesi için başlangıç dozunun yarısı ile devam edildi. Cerrahi alanları elektrikli tıraş makinesi ile temizlendi. Deney hayvanları dört ekstremiteleri flaster ile supine pozisyonda tespit edildi. Ameliyat alanı %10 povidon-iodin ile temizlendi ve cerrahi süresince sterilite koşulları sağlandı.

Morbiditenin azaltılmasına yönelik iki taraflı lomber kesi yerine vertikal planda abdominal kesi tercih edildi. Ksifoid çıkıntısı ve suprapubik bölge arasında yaklaşık olarak 2-3cm uzunluğunda kesi yapıldı. Cilt kesisini takiben her iki rektus abdominis kası arasından girildi. Rektus kılıfı ve periton geçildikten sonra sağ nefrektomi için cilt, bağırsak ansları ve karaciğer ekarte edildi. Karın içerisi yapılara zarar vermemek için bağırsaklar deney hayvanının vücut ısısına uygun ısıda gazlı bez üzerine konuldu.



Resim 3.2: 5/6 Nefrektomi modeli; abdominal kesi, bağırsaklar ve peritonun ekartasyonu, böbreklerin gösterilmesi.

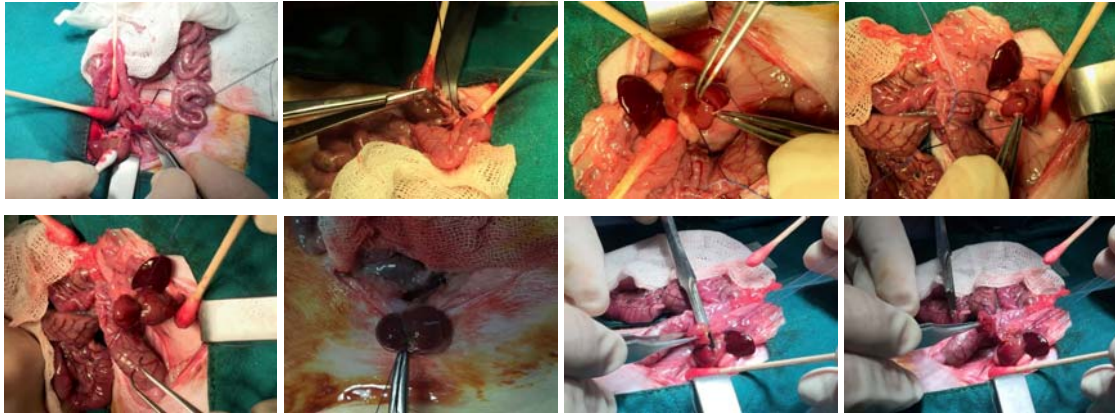
Işık mikroskobu altında sağ böbreğin kapsülü tamamen soyularak sürrenal bez korundu. Renal hilus bulunarak renal arter, ven ve üreter dikiş ile bağlandıktan sonra tüm deneklerde sağ böbrek eksize edildi. Eksize edilen böbrekler tartıldı.

Daha sonra vücut dışına alınan bağırsaklar karşı tarafa geçirildi. Uygun cilt ekartasyonu sonrasında dalak ekarte edilerek sol böbreğe ulaşıldı.

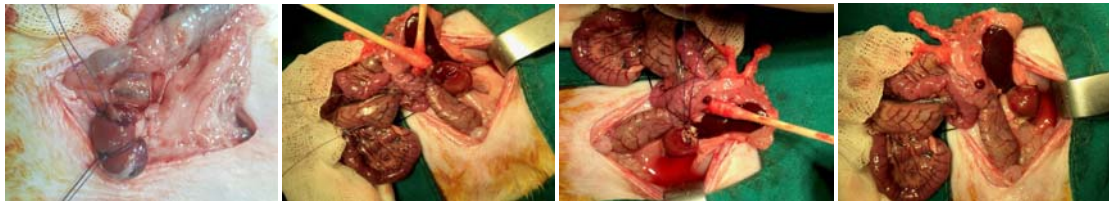
Böbreğin kapsülü karşı tarafta olduğu gibi sürrenal bez korunarak eksize edildi. Renal hilus mikrodiseksiyonla ortaya konularak renal arter, ven ve üreterin intakt olduğu gösterildi. Sol böbreğin üst ve alt polü dikişlerle korteks rengi solacak ancak renal korteksi kesmeyecek sıkılıkta bağlandı. Bağlamaların distal kısımları bistüri ile kesildi ve çıkan parçalar sağ böbreğin ağırlığının 2/3'ü olacak şekilde tartıldı.

Tartı eksikliği durumunda az alınan polden tekrar eksizeyon uygulandı. Bipolar koter yardımı ile hemostaz sağlandı.

Daha sonra bağırsak ansları karın içindeki doğal pozisyonuna alındı. Periton kapaması öncesinde sıvı kayıplarının replasmanı için her deneğe yaklaşık olarak 2 cc intraperitoneal serum fizyolojik verildi. Sırasıyla periton, rektus abdominis kası yuvarlak vikril ile onarıldı. Cilt ipek dikiş kullanılarak onarıldı.



Resim 3.3: Sağ böbreğin damar yapılarının bağlandıktan sonra sağ nefrektomi uygulanması. Sol böbreğin üst ve alt pollerinin bağlanarak 2/3 sol nefrektomi uygulanması.



Resim 3.4: Sol böbreğin üst ve alt pollerinin bağlanarak 2/3 sol nefrektomi uygulanması ve kanayan kısımların koterize edilmesi

3.5.1 Cerrahi kırık modeli oluşturulması

Kırık modeli oluşturmada standardizasyonu sağlamak amacıyla tüm deneklerin sağ femurlarına osteotomi uygulandı. Kırık hattı cetvel ile femur proksimal ve distali ölçülerek diafizi baz alınarak insizyon işaretlenen alandan yapıldı. Üç nokta bükme testiyle oluşabilecek kontrolsüz kırığı önlemek ve tüm deneklerde aynı kırık modelinin oluşturulması açısından tur motoru (Dremel 3000, model 255) ile kesici uç (elmas uç) kullanılarak tüm deneklerde sağ femur diafizine osteotomi uygulandı.

Kırık fiksasyonu aşamasında Kirschner tellerinin kalınlığı literatür üzerinden değerlendirmeler sonucu 1.2mm ve 1.5mm olacak şekilde hazır edildi. Pilot çalışmada intraoperatif femur medullasının genişliği değerlendirilerek 1,2mm olan k-telleri kullanılarak kırık fiksasyonu sağlandı, daha sonra çalışmadaki tüm deneklerde standardizasyon açısından tüm fiksasyonlarda 1,2mm'lik steril k-telleri kullanıldı. Distalde diz eklemine geçmeyecek şekilde distal kortekse sabitlendi. Proksimalde trokanter üzerinden çıkacak şekilde k-teli retrograd olarak kırık hattından gönderildi. Proksimal kısımlar bükülerek rotasyonu olabilecek en üst seviyede engelleme amacıyla trokanter üzerine saplandı. Bu işlem esnasında trokanter üzerine ek insizyon uygulaması yapılmadı.

Birçok çalışmada plak ve vida ile sabitleme veya eksternal fiksatörü kullanılmış olmakla birlikte gerek klinik kullanım rahatlığı gerek maliyet uygunluğu açısından k-teli tercih edilmiştir.

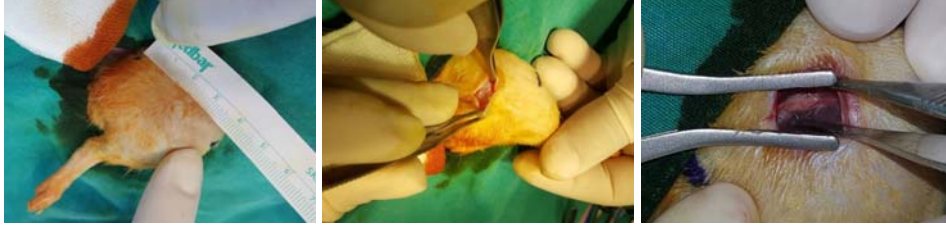
İntramedüller fiksasyon yöntemleri her ne kadar dikkatli uygulansa da literatürde yüksek rotasyon oranları bulunmaktadır . Majkowski ve ark. 43 hasta içeren çalışmasında 22 hastada çeşitli derecelerde kötü kaynama ve kısalık tespit etmişlerdir.

Grup II ve IV'teki hayvanların KBH cerrahisini takiben 4. haftada KBH geliştiği kanıtlandıktan sonra kırık oluşturulması amacıyla deneklere osteotomi planlandı. Osteotomi için tur motoru ve elmas matkap ucu kullanıldı.

Anestezi için tüm hayvanlara periton içine 40 mg/kg ketamin hidroklorür, 5 mg/kg ksilazin hidroklorür uygulandı. Anestezi derinliği ekstremitelere çekme yanıtı ile değerlendirildi. Anestezinin idamesi, başlangıç dozunun %50'si ile sağlandı.

Ameliyat alanları elektrikli tıraş makinesi ile temizlendi. Tüm hayvanlar üç ekstremiteden flaster ile supin pozisyonda tespit edildi. Cerrahi uygulanacak sağ bacak serbest bırakıldı. Cerrahi alanı %10 povidon-iodin ile temizlendi ve cerrahi süresince sterilizasyon koşulları sağlandı.

Tüm deneklerin sağ femur trokanterleri işaretlenerek yaklaşık 1,5cm lik distalinde femur diafizleri işaretlendi. Tüm deneklerin sağ femur diafizi üzerine yaklaşık 1cm lik kesi yapılması planlandı.



Resim 3.5: Deneklerin sağ femur trokanter üzerinden dize olan mesafenin ölçümü ve sağ femur diafizi üzerinden mini insizyonla girilerek femura ulaşılması.

Tüm deneklerde sağ femur üzerinden yapılan 1cm'lik minimal invaziv cilt kesilerini takiben kas ve yumuşak doku diseksiyonu minimal olarak yapıldı. Tüm deneklerde sağ femur diafizlerine ulaşılarak mini insizyonla kemiğin periostu osteotomi uygulanmasına yetecek ölçüde açıldı. Periost ekartörü yardımıyla yumuşak dokular ekarte edilerek femur diafize tur motoru yardımıyla osteotomi modeli oluşturuldu.



Resim 3.6: Deneklerin sağ femur diafizleri işaretlenerek tur motoru ile osteotomi uygulanması

Osteotomi oluşturulmasını takiben 1.5mm lik steril hazırlanan Kirschner telleri tüm denekler için tel makası ile uygun boyutlarda kesilerek stabilite amacıyla kullanılmak üzere hazır edildi. Kırık hattından gönderilen k-teli proksimalde trokanter majör üzerinden çıkarılarak daha sonra osteotomi hattından k-telinin distal kısmı kemik distaline gönderilerek femur distal korteksine geldiğinde kortekse saplanarak intramedüller çivileme yöntemi ile kırık fiksasyonu sağlanmış oldu.

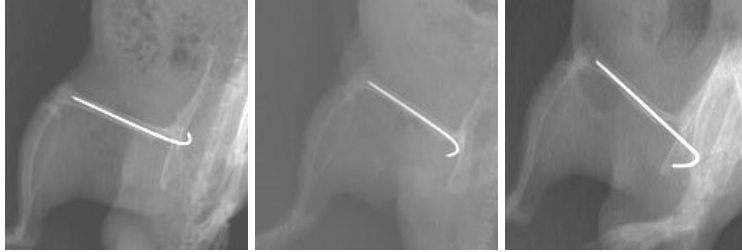


Resim 3.7: Osteotomi sonrası k-teli ile fiksasyon sağlanması ve cerrahi alan kapatılması

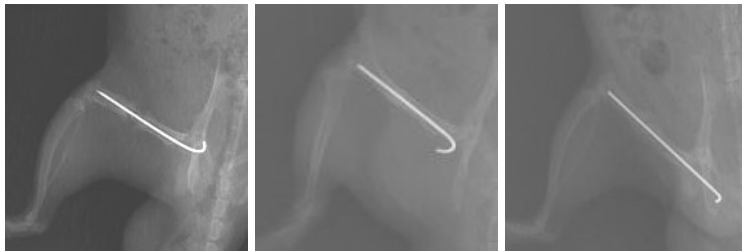
K-telinin proksimal kısmı bender ile bükülerek cilt altından trokanter majör e sabitlendi. Hayvanların eklem hareketinin devamlılığını sağlamak açısından distalde k-telinin diz eklemine geçmemesine özen gösterildi. Daha sonra cilt altında kalan telin üzerindeki 0.5cm lik proksimal cilt kesisi tek ve primer sutureasyon ile suture edildi.

Kırık hattı kontrol edilerek kalem ile işaretlenmiş olan çizgiler rotasyonu engellemek amacıyla uc-uca getirilecek şekilde kırık uçlarının uygun teması sağlandı. Cilt altı yumuşak doku ve fasya 4/0 vikril dikiş ile kapatıldı. 1cm'lik cilt 3/0 ipek dikiş ile 2 adet primer suture ile kapatıldı.

Kırık fiksasyonunu takiben tüm deneklere sağ femur grafisi çekildi.



Resim 3.8: Tüm gruplardan rastgele seçilmiş post-op 0.gün grafi örnekleri



Resim 3.9: Tüm gruplardan rastgele seçilmiş post-op 4.hafta grafi örnekleri

3.6 Deney Kronolojisi:

- 1. Gün:** Grup II ve IV: Ağırlık ölçümü, kuyruk kanlarının alınması, 5/6 KBH modeli ile nefrektomi uygulanması.
- 4. Hafta:** Grup II ve IV: KBH takibi amaçlı ağırlık ölçümü, kuyruk kanından hemoglobin, üre ve kreatini alınması.
- Grup I, II, III, IV: Tüm deneklerin sağ femurlarına osteotomi uygulanması. Tüm deneklere post-op grafi çekilmesi.
- Grup III ve IV: Tüm deneklere osteotomi sonrasında post-op 1.günde 34 hafta boyunca her sabah 20mikrogram/kg/gün Teriparatid (Forsteo) subkutan enjeksiyon uygulamasının başlanması.
- 8. Hafta:** Grup III ve IV: Tüm deneklere osteotomi sonrasında post-op 1.günde başlanan ve 4hafta boyunca her sabah 20mikrogram/kg/gün devam eden Teriparatid (Forsteo) subkutan enjeksiyon uygulamasının sonlandırılması.
- Grup II ve IV: KBH takibi amaçlı ağırlık ölçümü, kuyruk kanından hemoglobin, üre ve kreatini alınması.
- Grup I, II, III, IV: Tüm deneklere post-op grafi çekilmesi sonrasında tüm deneklerin sakrifiye edilmesi.

Grup I: (Kontrol grubu): İlk 4 hafta hayvanlara cerrahi uygulanmayacak. 4. haftanın sonunda hayvanların tamamına osteotomi ve fiksasyon uygulanacaktır. Fiksasyon sonrasında tüm hayvanlara grafi çekilecektir.

8. haftada hayvanlara grafi çekildikten sonra sakrifiye edilerek histopatolojik inceleme için sağ femurları alınıp patolojiye gönderilecektir.

Grup II: (KBH'lı kontrol grubu): Deneyin ilk günü gruptaki tüm hayvanlardan kuyruk kanı alınacak ve üre, kreatin ve hemoglobin başlangıç değerleri çalışılacak. Tüm deneklere 5/6 nefrektomi modeli uygulanacak. KBH parametresi olarak 4. haftada üre, kreatinin, hemoglobin değerleri ölçülecektir. 4. haftanın sonunda hayvanların femurlarında kırık oluşturulacaktır. Kırık fiksasyonunu takiben çalışmanın radyolojik görüntülemesi yapılacaktır. 8.haftada sakrifikasyon öncesi hayvanlardan üre, kreatin ve hemoglobin takibi açısından kuyruk kanı alınacak ve femur grafisi çekilecektir.

8. haftada hayvanlara grafi çekildikten sonra sakrifiye edilerek histopatolojik inceleme için sağ femurları alınıp patolojiye gönderilecektir.

Grup III: (KBH olmayan ilaç grubu): İlk 4 hafta hayvanlara cerrahi uygulanmayacak. 4. haftanın sonunda hayvanların tamamına osteotomi ve fiksasyon uygulanacaktır. Fiksasyon sonrasında tüm hayvanlara grafi çekilecektir. Osteotomi uygulamasını takiben post-op 1.günde gruptaki tüm deneklere 20mikrogram subkutan Teriparatid (Forsteo, Lilly İlaç) enjeksiyonu uygulaması başlanacak ve 4 hafta süresince her 24 saatte 1 kez uygulanacaktır. 8. haftada hayvanlara grafi çekildikten sonra sakrifiye edilerek histopatolojik inceleme için sağ femurları alınıp patolojiye gönderilecektir.

Grup IV: (KBH'lı ilaç grubu): Deneyin ilk günü gruptaki tüm hayvanlardan kuyruk kanı alınacak ve üre, kreatin ve hemoglobin başlangıç değerleri çalışılacak. Tüm deneklere 5/6 nefrektomi modeli uygulanacak.

KBH parametresi olarak 4. haftada üre, kreatinin, hemoglobin değerleri ölçülecektir. 4. haftanın sonunda hayvanların femurlarında kırık oluşturulacaktır. Kırık fiksasyonunu takiben çalışmanın radyolojik görüntüleme yapılacaktır.

Osteotomi uygulamasını takiben post-op 1.günde gruptaki tüm deneklere 20mikrogram subkutan Teriparatid (Forsteo, Lilly İlaç) enjeksiyonu uygulaması başlanacak ve 4 hafta süresince her 24 saatte 1 kez uygulanacaktır. 8.haftada sakrifikasyon öncesi hayvanlardan üre, kreatin ve hemoglobin takibi açısından kuyruk kanı alınacak ve femur grafisi çekilecektir. 8. haftada hayvanlara grafi çekildikten sonra sakrifiye edilerek histopatolojik inceleme için sağ femurları alınıp patolojiye gönderilecektir.

3.7 Makroskopik değerlendirme

Kemik iyileşmesinin makroskopik değerlendirmesi radyolojik olarak yapılmıştır. Radyolojik tetkikler Başkent Üniversitesi Ankara Hastanesi Radyoloji bölümünde, radyolojik değerlendirme Başkent Üniversitesi Adana Hastanesi Radyoloji bölümünde gerçekleştirilmiştir.

3.8 Radyolojik değerlendirme

Tüm hayvanlara deney bitiminde (8. Haftada) sakrifiye edilmelerini takiben kemik iyileşmesi ve kallus değerlendirilmesine yönelik direkt grafi görüntülemesi yapıldı.

KBH olan hayvanların femurları KBH olmayan hayvanların femurlarıyla, ayrıca Teriparatid kullanılan hayvanların femurları kullanmayanlarla, Teriparatid kullanan KBH olan grup Teriparatid kullanmayan KBH grubuyla, Teriparatid kullanan sağlıklı grup da Teriparatid kullanmayan sağlıklı grup femurlarıyla karşılaştırıldı. Oluşan kallus dokusu direk grafilerde ölçüldü. Deneklerin femurları Rust skorlama sistemine göre değerlendirildi.

3.9 Laboratuvar değerlendirmesi

KBH uygulanan Grup II ve IV hayvanların böbrek fonksiyon testleri bakılmasına yönelik 0, 4 ve 8. haftalarda kuyruk kanları alındı. Alınan kan örnekleri Başkent Üniversitesi Adana Hastanesi Klinik Biyokimya Laboratuvarında değerlendirildi.

3.9.1 Kronik böbrek hastalığı doğrulanması

KBH'ın biyokimyasal değerlendirilmesine yönelik 0, 4 ve 8. haftada Grup II ve IV 'teki hayvanların kanında BUN, kreatinin ve hemoglobin değerlerine bakıldı. Her hayvan için yaklaşık 500 mikrolitre kan EDTA'lı hemogram tüplerine alındı. Hayvanların serum BUN düzeyleri Advia 1800 üreaz metoduyla kinetik olarak ölçüldü. Serum kreatinin düzeyleri Advia 1800 cihazında kinetik alkalın pikrat metoduyla kolorimetrik olarak değerlendirildi.

Kan hemoglobin seviyeleri EDTA'lı kandan fotometrik-kinetik yöntemle otomatize Advia 2120İ cihazında ölçüldü. Hayvanların cerrahi morbidite ve KBH'a bağlı oluşabilecek komplikasyonlar göz önünde bulundurularak kan alma işlemleri testlere elverişli olacak en düşük miktarda tutuldu.

3.10 Histopatolojik değerlendirme

Gruplardaki tüm hayvanlar sakrifiye edilerek alınan sağ femurları inceleme amaçlı patoloji laboratuvarına getirildi. Tüm kemikler numaralandırıldı. Biyopsi örnekleri %10'luk nötral formaldehid solüsyonu içerisinde konularak fikse edildi ve 4°C'de 48 saat bekletildi.

Kemik dokuların formaldehid fiksasyonunu takiben Morse Çözeltisi ile (%10'luk sodyum sitrat, %20'lik formik asit) dekalsifikasyon işlemi uygulandı. Kemik dokular 4 gün sonra dekalsifikasyon sıvısından çıkarıldıktan sonra tekrar formaldehite konularak muhafaza edildi.

Kemik dokunun proksimal ve distal metafizleri kallus dokusuna zarar vermeyecek şekilde kesildi. Her iki uçtan kemik korteks ve medullasının bütün halde değerlendirilmesi açısından aksiyel kesitler alındı.

Daha sonra osteotomi hattına dik olacak şekilde kemiğin uzun aksına paralel kesitler alındı. Kemiğin medullaya bakan kısmı kasetin alt kısmına denk gelecek şekilde yerleştirildi.

Parafin bloğa gömülen dokulardan 5 µm kalınlığında kesitler hazırlanarak hematoksilin-Eozin (H&E) ile lam boyaması yapıldı. Işık mikroskobu altında kesitler incelendi. Bu biyopsilerin histopatolojik incelemeleri Başkent Üniversitesi Adana Hastanesi Patoloji A.D.'da aynı patolog tarafından, örneklerin hangi gruba ait olduğu bilinmeksizin (kör olarak) yapıldı.

3.11 Kemik dokunun mikroskopik değerlendirilmesi

Kemik iyileşmesinin derecesi Allen ve ark.'nın tanımladığı sınıflandırma kullanılarak yapıldı. [11] Bu sınıflandırmada kırık dokunun kemik dokuya dönüşümü ve kallus dokusunda kemikleşmeyi gösteren 7 farklı skor mevcuttur;

Skor 0; Kemik birleşmemesi (non-union), (fibröz dokular)

Skor 1; Tamamlanmamış kırık dokunun birleşmesi (fibröz doku içeren kırık dokusu)

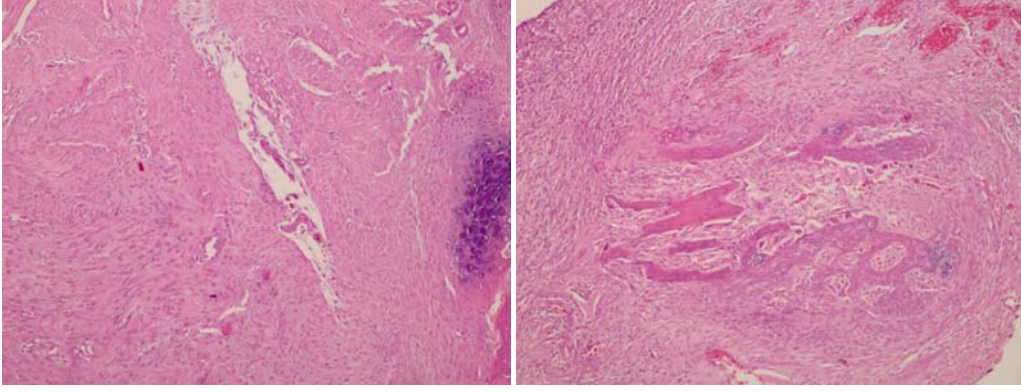
Skor 2; Tamamlanmış kırık dokunun birleşmesi (tamamen kırık dokusu)

Skor 3; Tamamlanmamış kemik birleşmesi (az seviyede kemikleşme), (az miktar trabeküler kemik ile birlikte yoğun miktarda kırık dokusu)

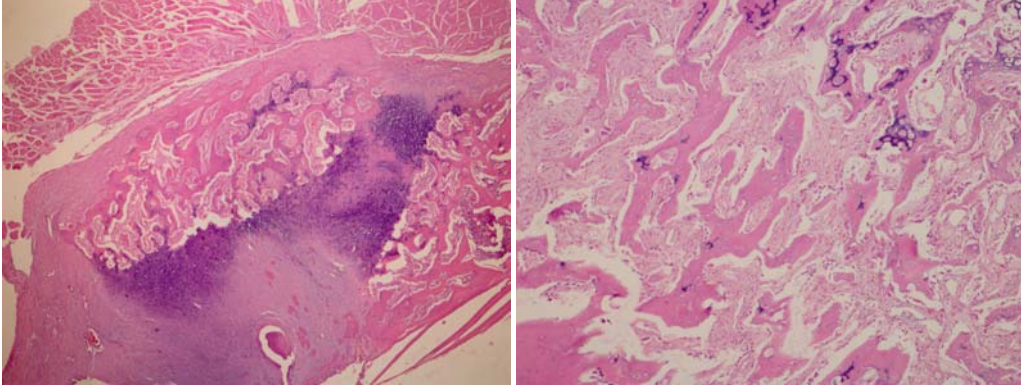
Skor 4; Tamamlanmamış kemik birleşmesi (orta seviye kemikleşme), (eşit miktarda kırık dokusu ve kemik dokusu)

Skor 5; Tamamlanmamış kemik birleşmesi (ileri seviye kemikleşme), (az miktar kırık dokusu ile birlikte yoğun miktarda trabeküler kemik)

Skor 6; Tam kemik kaynaması (tamamen kemik doku). [12]



Resim 3.2: Allen ve ark. kırık iyileşmesi skorlamaları; Kemiklerin mikroskop altında görüntüsü, H&E boyama, x10 büyütmede. A; skor 1, B; skor 3 örnekleri



Resim 3.3: Allen ve ark. kırık iyileşmesi skorlamaları; Kemiklerin mikroskop altında görüntüsü, H&E boyama, x4 ve x10 büyütmede. A; skor 4, B; skor 5 örnekleri

3.12 Biyoistatistiksel değerlendirme

Kemik iyileşmesi parametreleri; radyolojik incelemeler, histopatolojik inceleme sonucunda bulunan osteoblast yoğunlukları, kallus dokusu büyüklüğü verilerinin gruplar arasındaki farkları istatistiksel olarak değerlendirildi.

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 17.0 paket programı kullanıldı. Kategorik ölçümler sayı ve yüzde olarak, sürekli ölçümlerse ortalama ve standart sapma (gerekli yerlerde ortanca ve minimum - maksimum) olarak özetlendi. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında Ki Kare test ya da Fisher test istatistiği kullanıldı. Gruplar arasında sürekli ölçümlerin karşılaştırılmasında dağılımlar kontrol edildi, parametreler normal dağılım göstermediği için Kruskal Wallis Testi kullanıldı, grupların ikili karşılaştırmalarında ise Mann Whitney U testi kullanıldı. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0.05 olarak alındı.

Grup	İSTATİSTİK DEĞER	ALLEN S.	NEKROZ	VAS. PROLİF.	İNF.	BİRLEŞME	RUST SKORU	KALLUS KALINLIĞI
I	MEAN	3.38	0.75	0.50	0.63	0.63	2.38	1.538
	ST.DEVİASYON	1.302	0.463	0.535	0.518	0.518	0.518	0.7763
II	MEAN	3.88	1.00	0.63	0.88	0.25	2.00	0.738
	ST.DEVİASYON	1.458	0.00	0.518	0.354	0.463	0.756	0.6781
III	MEAN	2.50	0.88	0.50	0.88	0.25	2.25	1.775
	ST.DEVİASYON	1.604	0.354	0.535	0.354	0.463	0.463	0.7126
IV	MEAN	3.00	0.38	0.00	0.50	0.75	2.75	1.500
	ST.DEVİASYON	1.927	0.518	0.000	0.535	0.463	0.463	0.3464

Tablo 3.1; Tüm istatistik verilerin ortalama ve standart sapmaları

4. BULGULAR

4.1 Ağırlık değerlendirilmesi

Deneyin başlangıcı, deneyin 4 ve 8. haftalarda Grup II ve IV de bulunan KBH'li hayvanların ağırlıkları ölçüldü. Ağırlık değişimi tespitine yönelik sıçanlar 0, 4 ve 10. haftalarında tartıldı. Grup II ve IV de bulunan KBH'li sıçanların ağırlık değişimi literatüre benzer şekilde anlamlı olarak bulundu. [13]

GRUP I	0.H AĞIRLIK(gr)	4.H AĞIRLIK(gr)	8.H AĞIRLIK(gr)
<i>Denek 1</i>	410	408	396
<i>Denek 2</i>	426	426	417
<i>Denek 3</i>	380	382	364
<i>Denek 4</i>	405	414	409
<i>Denek 5</i>	405	400	378
<i>Denek 6</i>	342	336	324
<i>Denek 7</i>	462	457	475
<i>Denek 8</i>	396	390	390

Tablo 4.1; Grup I deneklerin 0, 4 ve 8.hafta ağırlık ölçümü

GRUP II	0.H AĞIRLIK(gr)	4.H AĞIRLIK(gr)	8.H AĞIRLIK(gr)
<i>Denek 1</i>	433	384	339
<i>Denek 2</i>	405.9	352	324
<i>Denek 3</i>	420	358	334
<i>Denek 4</i>	370	348	299
<i>Denek 5</i>	370	310	456
<i>Denek 6</i>	443	389	293
<i>Denek 7</i>	379	389	347
<i>Denek 8</i>	406	360	309

Tablo 4.2; Grup II deneklerin 0, 4 ve 8.hafta ağırlık ölçümü

GRUP III	0.H AĞIRLIK(gr)	4.H AĞIRLIK(gr)	8.H AĞIRLIK(gr)
<i>Denek 1</i>	433	433	385
<i>Denek 2</i>	409	400	368
<i>Denek 3</i>	445	451	459
<i>Denek 4</i>	412	400	380
<i>Denek 5</i>	420	420	344
<i>Denek 6</i>	376	370	374
<i>Denek 7</i>	408	405	347
<i>Denek 8</i>	440	432	370

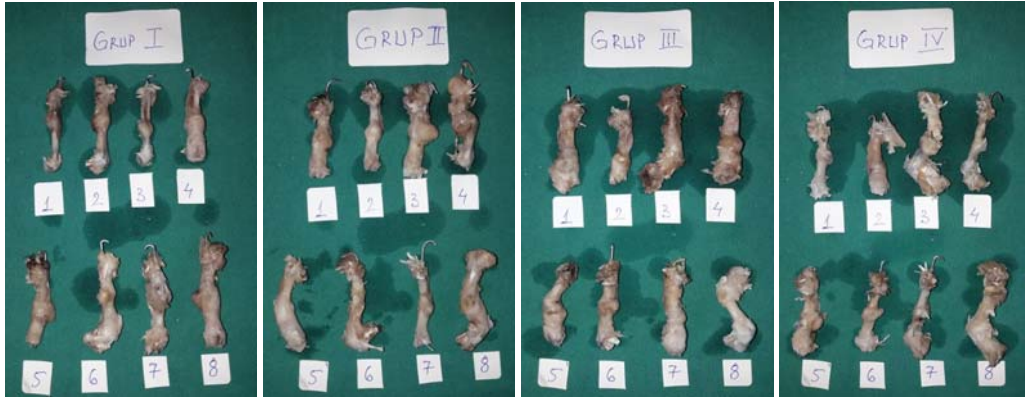
Tablo 4.3; Grup III deneklerin 0, 4 ve 8.hafta ağırlık ölçümü

GRUP IV	0.H AĞIRLIK(gr)	4.H AĞIRLIK(gr)	8.H AĞIRLIK(gr)
<i>Denek 1</i>	422	337	290
<i>Denek 2</i>	445	346	346
<i>Denek 3</i>	428	259	211
<i>Denek 4</i>	417	268	291
<i>Denek 5</i>	428	321	313
<i>Denek 6</i>	392	283	320
<i>Denek 7</i>	477	300	342
<i>Denek 8</i>	428	292	297

Tablo 4.4; Grup IV deneklerin 0, 4 ve 8.hafta ağırlık ölçümü

4.2 Kemiklerin makroskopik bulguları

Kemik dokuların iyileşmesi gruplar arasında tarafsız olarak karşılaştırıldı. Morfolojik olarak kallus dokusu miktarı ve kemiğin düzgün iyileşmesi sırası ile Grup III> Grup I> Grup IV> Grup II olarak bulundu.



Resim 4.1: Kemik dokuların dekalsifikasyonu sonrası makroskopik görüntüsü

4.3 Kemik iyileşmesinin radyolojik bulguları

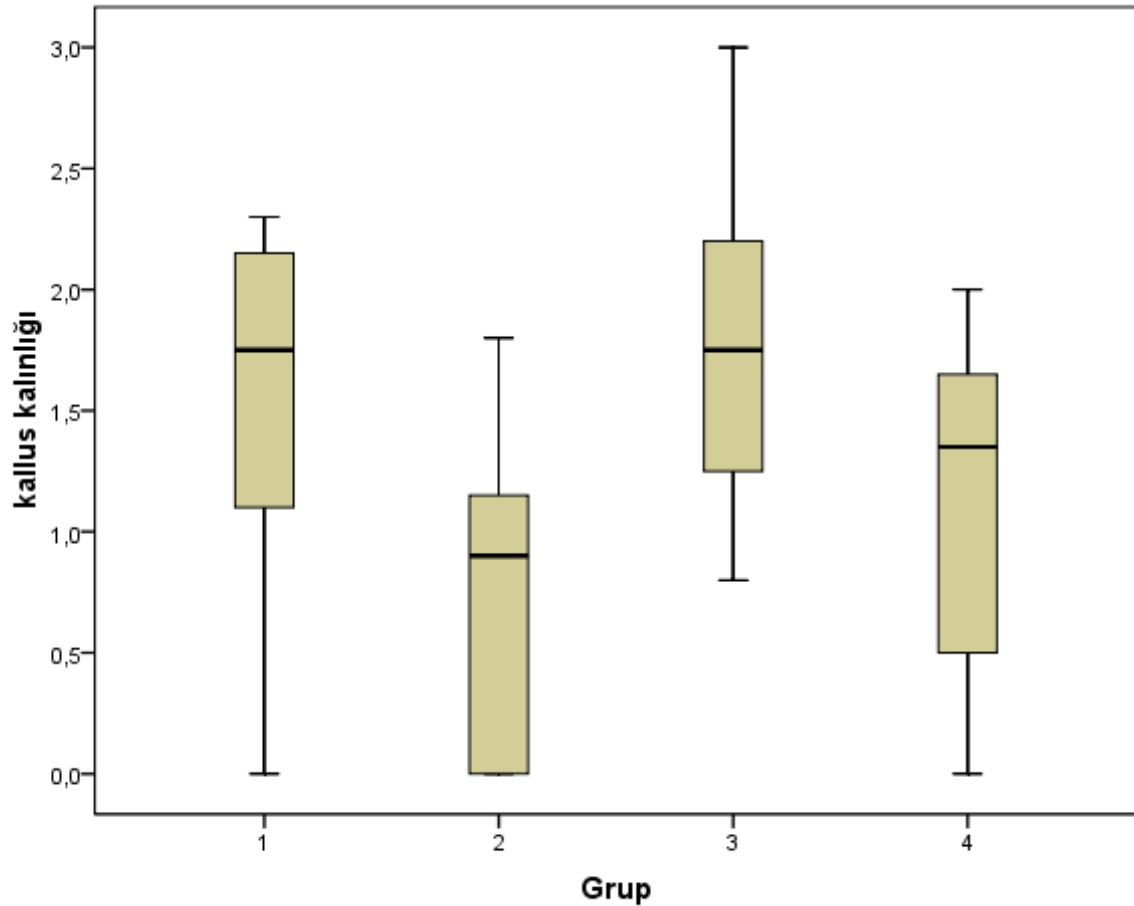
Rust skorlama sistemine göre yapılan skorlamada test sonuçları: Grup I (2.38 ± 0.518), Grup II (2.00 ± 0.756), Grup III (2.25 ± 0.463), Grup IV (2.75 ± 0.463) olarak bulundu.

DENEK NO	GRUP I	GRUP II	GRUP III	GRUP IV
1	3	1	2	3
2	2	3	2	3
3	3	2	3	3
4	2	2	2	2
5	2	3	2	3
6	2	1	2	3
7	3	2	3	3
8	2	2	2	2

Tablo 4.5: Tüm deneklerin Rust skorlaması sonuçları

Kortikal kemik iyileşme bölgesinden, kallusun en dış noktasına olan kalınlıklarının ölçülmesi sonucu ortalama kallus kalınlıkları; Grup I (1.538 ± 0.7763), Grup II (0.738 ± 0.6781), Grup III (1.775 ± 0.7126), Grup IV (1.500 ± 0.3464) olarak ölçüldü.

Grup I ve III (KBH oluşturulmamış) deneklerin kallus kalınlıkları Grup II'ye (KBH oluşturulmuş ancak Teriparatid uygulanmamış) göre anlamlı olarak daha kalın ölçüldü ve istatistiksel olarak aralarındaki fark anlamlı bulundu ($p=0.041$).



Grafik 4.1: Tüm gruplarda radyolojik olarak kallus kalınlığının gösterilmesi, Grup II deneklerde kallus kalınlığı diğer gruplardaki deneklere göre düşük olarak saptanmış, istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p=0.041$)

4.4 Kan örnekleri test sonuçları

KBH'ın biyokimyasal olarak değerlendirilmesine yönelik 0, 3 ve 6. hafta kanlarında BUN, kreatinin ve hemoglobin bakılması önerilmektedir. [14] Çalışmamızda KBH cerrahisinin yapıldığı gün 0.gün olarak ve osteotominin yapıldığı gün ve sonlandırıldığı günler 4 ve 8.haftalar olarak belirlenmiştir. Bu nedenle KBH tayini amacıyla deneklerin kan örnekleri 0, 4 ve 8.haftalarda üre, kreatin ve hemoglobin değişikliklerinin gösterilmesi amacıyla alınmıştır.

İnsanlarda KBH takibinde 24 saatlik idrarda GFH hesabı altın standart olarak değerlendirilmektedir ancak hayvan modellerinde metabolik kafes temininin zorluğu nedeni ile 24 saatlik idrarda GFH hesabı yerine KBH tanısında kan sonuçları takibi yöntemi kullanılmıştır.

Grup II (KBH) ve Grup IV (KBH + Teriparatid)'ün böbrek parametreleri açısından kan BUN, kreatinin seviyelerindeki yükselme ve hemoglobin seviyelerindeki düşüş Tablo 4.6 ve Tablo 4.7'de gösterilmiştir.

DENEK	HGB			BUN			KREA.			
	GRUP II	0.gün	4.hafta	8.hafta	0.gün	4.hafta	8.hafta	0.gün	4.hafta	8.hafta
Denek 1		14.6	12.0	12.1	22	64	76	0.4	1.0	1.2
Denek 2		14.8	13.9	13.0	19	48	63	0.4	0.7	1.2
Denek 3		15.4	11.1	12.8	16	50	90	0.4	0.9	1.5
Denek 4		14.6	13.0	8.3	16	39	67	0.4	0.7	1.4
Denek 5		14.6	12.3	16.2	16	55	35	0.4	0.9	0.6
Denek 6		15.3	12.4	10.8	18	54	52	0.4	1.0	0.8
Denek 7		14.7	12.1	12.1	16	55	93	0.4	0.9	1.6
Denek 8		14.6	12.9	10.2	13	47	52	0.3	0.8	0.8

Tablo 4.6; Grup II deneklerin 0, 4 ve 8.hafta laboratuvar verileri

DENEK	HGB			BUN			KREA.			
	GRUP IV	0.gün	4.hafta	8.hafta	0.gün	4.hafta	8.hafta	0.gün	4.hafta	8.hafta
Denek 1		14.8	11.8	10.2	18	81	90	0.4	1.5	1.7
Denek 2		15.4	12.7	13.8	13	40	46	0.3	0.6	0.7
Denek 3		15.8	12.1	13.0	17	86	69	0.4	1.0	1.2
Denek 4		14.2	13.1	15.0	13	40	35	0.3	0.7	0.5
Denek 5		15.6	12.8	12.4	23	42	48	0.6	0.6	0.7
Denek 6		14.9	11.8	13.9	18	27	36	0.4	0.5	0.6
Denek 7		14.4	14.1	13.1	23	36	45	0.7	0.7	0.6
Denek 8		15.4	13.6	7.8	15	26	41	0.4	0.4	0.4

Tablo 4.7; Grup IV deneklerin 0, 4 ve 8.hafta laboratuvar verileri

4.5 Histopatolojik değerlendirme bulguları

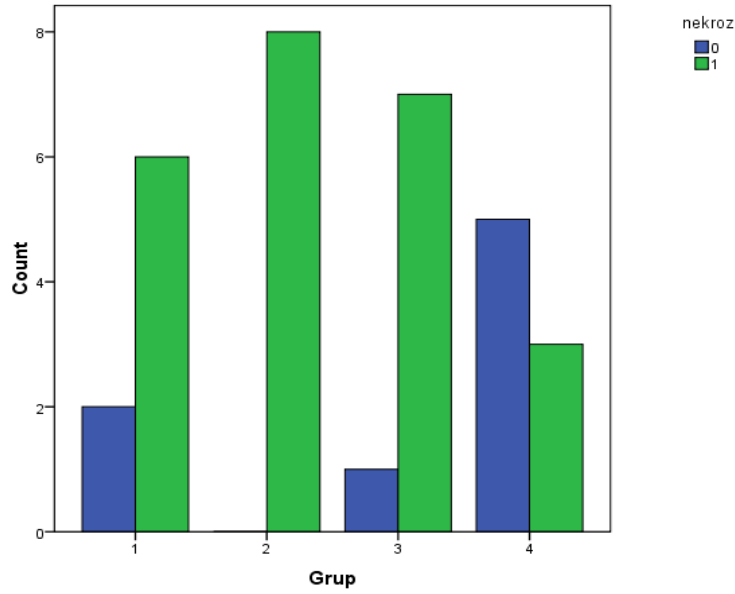
Grup I, Grup II, Grup III, Grup IV sıçanların kemik iyileşmesinin histopatolojik araştırılmasında Allen skorlama sistemi, kallus oluşumu, kallus dokusundaki kemikleşme miktarı ve nekroz varlığı ölçülerek skorlandı.

4.6 Kemik iyileşmesinin histopatolojik değerlendirmesi

Kemik dokunun iyileşme skorlaması (Allen skorlaması) sonuçları; Grup I (3.38 ± 1.302), Grup II (3.88 ± 1.458), Grup III (2.5 ± 1.609), Grup IV (3.0 ± 1.927) olarak bulundu. Denekler kırık sonrası kallus dokusundaki kemikleşme miktarına göre değerlendirildi.

Denek No	Allen skorlaması sonuçları			
	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV
1	4	3	4	4
2	3	3	1	5
3	3	1	3	4
4	5	4	0	4
5	3	5	4	3
6	3	5	4	0
7	5	5	1	4
8	1	5	3	0

Tablo 4.8: Kemik iyileşmesinin patolojik skorlaması olan Allen skorlaması sonuçları



Grafik 4.2: Tüm gruplarda histopatolojik olarak nekrozun gösterilmesi, Grup IV deneklerde nekroz oluşumu histopatolojik daha az olarak saptanmış, istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p=0.025$)

5. TARTIŞMA

Kırık iyileşmesi ve bunu hızlandırmak amacıyla çeşitli farmakolojik ajanların kullanıldığı çalışmalara her geçen gün yenisi eklenmektedir. Ancak bunların büyük bir çoğunluğu olumlu sonuçlar vermek konusunda eksik kalmakta veya bir kısmında olduğu gibi ajanlar arasında belirgin olumlu fark gözlenmemektedir.

Fredrik Agholme ve ark. Kırık iyileşmesinde Sklerostin antikor tedavisi ve düşük doz PTH'u karşılaştırmışlar. Proksimal tibiada oluşturulan kırık fiksasyonu vidalar ile sağlanmış. 4hafta boyunca deneklerin bir kısmına günlük 25mg/kg sklerostin diğer gruba ise 5mg/kg PTH verilmiş. Kırık iyileşmesi x-ray ve micro-CT ile değerlendirilmiş. PTH kullanılan grupta vidalarda pull-out oranı %48 azalırken, sklerostin kullananlarda fark görülmemiş. Ancak femur dayanıklılığı sklerostin kullanılan grupta artarken PTH kullanan grupta fark saptanamamış. [15]

Hiroshi Yamane ve ark.'nın yaptığı başka bir çalışmada tavşanlar üzerinde kısa süreli günlük PTH kullanımında endosteal kemik oluşumu üzerine etkisi çalışılmış. Günlük PTH kullanımının kortikal proziteyi arttırdığı bilindiği ancak aralıklı kullanımdaki etkilerinin bilinmediği konusundan yola çıkarak çalışmaya başlanmıştır. Denekler 4gruba ayrılarak (verilen doza göre); 20µg/kg/gün, 40µg/kg/gün, 20µg/kg/hafta ve 40µg/kg/hafta olarak ayrılmış. 4hafta sonunda sonuçlar micro-CT, histomorfometri ve three-dimensional second harmonic generation (3D-SHG) görüntüleme yöntemiyle kemik kollajen doku değerlendirilmiş. Analiz sonuçlarına bakıldığında günlük yüksek doz kullananlarda sonuçların kemiğin mikroyapısına daha zararlı etkileri olduğu gözlenmiştir. [16]

R. Skripitz ve P. Aspenberg'in çalışmasında ise implant fiksasyonu sonrası aralıklı PTH(1-34) uygulamasının osteoblastik aktiviteyi artırarak kemik yapımının artışı araştırılmış. 28 rat kullanılan çalışmada bir gruba 60 g/kg/gün PTH uygulanırken diğer gruba haftada bir kez uygulanmış. Çalışma sonucunda implant ve kemik arasındaki yumuşak doku varlığı değerlendirilmiş. Ve bu dokunun PTH kullananlarda daha az olduğu gözlenmiştir. [17]

Magnus Bernhardsson ve ark.'nın çalışmasında kansellöz kemikteki drill delikleri ve implante edilen vidalar değerlendirilmiş. Deneklerde alendronat ve PTH kullanılan deneklerde pull-out oluşumu arasında iki farmakolojik ajanı kullananlar arasında fark bulunamamış. [18]

Ciara M Murphy ve ark. ratlardaki kırık iyileşmesinde PTH (1-34) kullanımının bifosfonat turnoverini arttırdığını gösterdikleri çalışmasında PTH'nın kemik turnoverini arttırarak kemik iyileşmesie olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir. Çalışmada 25mg/kg/gün PTH(1-34) kullanılmış. Sonuçlar X-ray, micro-CT, autoradiography, and fluorescent confocal microscopy ile değerlendirilmiştir.

PTH kullanılanlarda intrasellüler bifosfonat düzeyindeki artışın osteoklastları rezorbe ettiği ve sonuç olarak PTH'nun hem kemik turnoverini hem de bifosfonat turnoverini arttırdığı gösterilmiştir. [19]

Naoki Okubo ve ark.'nın çalışmasında ise diğerlerinden farklı olarak yapay olarak üretilmiş femur üzerinde çalışılmış. PTH kullanılan sıçanların yapay olarak üretilmiş femurlarındaki kırıkdağın sirkadiyen ritmini düzenlediği gösterilmiştir. Çalışmada gerçek zamanlı bioluminescence microscopic görüntüleme PTH tip 1 resptörleri gözlenmiş ve bunların zaman ve doza bağlı olarak farklılık gösterdiği ve büyüme plağı ile eklem kırıkdağının sirkadiyen ritminin PTH tarafından indüklendiği gözlenmiş. Bu ritmin düzenlenmesi ile sadece osteoporozun değil encondral kemik büyümesi ve kırık iyileşmesi üzerinde etkili olacağı düşünülmüş. [20]

Tüm bu çalışmalardan farklı olarak Michael Pensak ve ark. 2015 yılında yaptıkları çalışmada demineralize edilmiş kemik matriksi ve PTH'nın kombine kullanımının kritik düzeyde femur kırık iyileşmesine etkisi olmadığını göstermiş. Femur diafizinde oluşturdukları 2mm lik defekt sonrasında fiksasyon sağlanmış. Denekler 3gruba ayrılmış; I) 30mg/kg/ gün PTH, II) 30mg/kg/gün DBM+PTH, III) 30mg/kg/gün DBM+ 30mL salin enjeksiyonu 28gün boyunca uygulanmış. Çalışma sonunda radyografi tüm gruplarda kırık iyileşmesinin olmadığını veya geciktiğini göstermiş. Bunun sonucunda anabolik ajan olan Teriparatid'in kırık iyileşmesinde tek başına veya DBM ile birlikte kullanımında yetersiz olduğu gösterilmiştir. [21]

Bizim çalışmamızda kırık iyileşmesi açısından KBH olan gruplar olmayanlarla, KBH olan gruplar ise Teriparatid kullanan ve kullanmayan, KBH olmayan gruplar da kendi içinde Teriparatid kullanan ve kullanmayanlar olarak karşılaştırıldı. Histopatolojik olarak Allen skorlamasına göre değerlendirildiğinde kırık kaynaması açısından gruplar arası fark bulunamazken, KBH olup teriparatid kullanan grupta nekroz oluşumu daha az saptandı ve sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu gözlendi ($p=0.025$).

Bu veriden yola çıkarak da uzun dönem kemik kaynaması açısından Teriparatid kullananlarda daha az nekroz oluşumunun uzun dönemde kırık iyileşmesine olumlu etkileri olacağı kanaatindeyiz.

Tüm veriler radyolojik olarak değerlendirildiğinde kallus kalınlığının diğer tüm gruplarla kıyaslandığında Grup II'de daha düşük olduğu görüldü ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.041$).

KBH varlığının kırık iyileşmesinde, tek başına bir neden olarak, gecikmeye yol açtığı saptandı. Deneklerde bu durum kallus kalınlığının KBH'lı gruplarda daha düşük olduğu gözlenerek saptandı.

Teriparatid kullanımı durumunda Grup IV'teki deneklerin kallus kalınlığının Grup II'deki deneklerden daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Grup II ortalama kallus kalınlığı 0.738 iken Grup IV'teki deneklerde ortalama kallus kalınlığı 1.500 olarak saptanmıştır. Bu durum Grup I deneklerde ortalama kallus kalınlığı 1.538 iken Grup III deneklerde 1.775 olarak saptanmıştır.

Bu verilerden yola çıkarak diyebiliriz ki KBH tek başına kırık iyileşmesinde gecikmeye yol açarken Teriparatidin aralıklı kullanımının KBH olan deneklerde kaynamaya olumlu etkileri olduğu gözlenmiştir. Bu durum da istatistiksel olarak kallus kalınlığı açısından anlamlı olarak bulundu.

Kısıtlılıklar;

Çalışmamızda radyolojik değerlendirme için konvansiyonel standard radyolojik görüntüleme yöntemi kullanılmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda mikro-CT yöntemi ile değerlendirme yapılmasıyla daha sağlıklı bir değerlendirme yapılabileceği yönündedir. Ayrıca çalışmamızda biyomekanik değerlendirme mevcut değildir. Ratların diğer ekstremilerinde biyomekanik çalışma düşünmemize karşın, her iki alt ekstremitede cerrahi uygulanması deneklerin hareket kabiliyetini kısıtlayacağı gerekçesi ile etik olmayacağı düşüncesi ile çalışmadan çıkarılmıştır. Çalışmaya biyomekanik değerlendirme eklenmesi çalışmanın gücünü artıracaktır. En büyük kısıtlılığımız denek sayısının optimal seviyede tutulmuş olmasıdır. Denek sayısının artırılması çalışmanın gücüne önemli ölçüde katkıda bulunacağı düşüncesindeyiz.

6. SONUÇ

KBH olan ve olmayan, Teriparatid kullanılan ve kullanılmayan olarak dört gruba ayrılarak çalışılan deneklerde hem Teriparatid kullanımının Kronik böbrek hastalığı olmayan deneklerde kırık iyileşmesinde hem de Kronik böbrek hastalarında oluşan kırıkların iyileşmesindeki etkileri gösterildi. Gruplar kendi içerisinde KBH olup ilaç kullanan ve kullanmayan, KBH olmayan ve ilaç kullanan-kullanmayan olarak değerlendirildi. Kronik böbrek hastalığı olan hastalarda kallus oluşumunun gecikmesi sorunsalı deneyimizde Kronik böbrek hastalığı olan ve Teriparatid kullanılan deneklerdeki kallus oluşumu Kronik böbrek hastalığı olan ancak Teriparatid kullanılmayan grupla karşılaştırıldığında makroskopik ve radyolojik kallus oluşumu daha erken evrede olduğu gözlemlendi. Ancak histopatolojik olarak değerlendirildiğinde kallus oluşumu açısından gruplar arasında fark gözlemlenmedi. Histopatolojik olarak Teriparatid kullanılan KBH grubunda nekroz varlığının diğer gruplara oranla daha az olduğu görüldü ve istatistiksel olarak anlamlı olarak saptandı. Ayrıca yapılan radyolojik ölçümler değerlendirildiğinde kallus kalınlığı KBH olup kırık iyileşmesi sürecinde herhangi bir ek tedavi almayan, deneyimizde Teriparatid kullanmayan, grupta diğerleri ile karşılaştırıldığında daha düşük olarak saptandı.

Bunun sonucunda çalışmamızda KBH varlığının tek başına kırık iyileşmesinde gecikmeye yola açtığı gözlemlendi. Teriparatid kullanımının gerek KBH olan gerek olmayanlarda kallus kalınlığını arttırmada olumlu etkileri olduğu gözlemlendi.

Çıkar çatışması;

Çalışmaya katılan katılımcıların yukarıda adı geçen ilaç firması ile herhangi bir bağlantısı yoktur. Çalışma Başkent Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

7. KAYNAKLAR

1. Moe S, Drüeke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, et al. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 69:1945-1953, 2006.
2. Kavaz A. Kronik böbrek hastalığı, son dönem böbrek yetmezliği ve böbrek nakli olan çocukların uzun dönem komplikasyonlarının belirlenmesi (ileriye dönük izlemli çalışma). Uzmanlık tezi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk sağlığı ve hastalıkları, Ankara, 2012.
3. National Kidney Foundation. K/DOQI Clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in children with chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis.* 42.1-201, 2003.
4. Wessling K, Bakkaloglu S, Salusky I. Chronic kidney disease mineral and bone disorder in children. *Periatr Nephrol.* 23:195-207, 2008.
5. Chauntin A, Ferris EB. Experimental renal insufficiency produced bu partial nephrectomy. *Arch Intern Med* 49:767-787, 1932.
6. Gagnon RF, Gallimore B, Characterization of a mouse model of chronic uremia. *Urol Res* 16.119-126, 1988.
7. Seth AK, De la Garza M, Fang RC, Hong SJ, Galiano RD (2013) Excisional Wound Healing Is Delayed in a Murine Model of Chronic Kidney Disease. *PLOSONE* 8(3): e59979. doi:10.1371/journal.pone.0059979.
8. Seth AK, De La Garza M, Fang RC, Hong SJ, Galiano RD. Excisional wound healing is delayed in a murine model of chronic kidney disease. *PLoS One.* 8(3): e59979, 2013.
9. Skripitz R, Andreassen T, Aspenberg P. Parathyroid hormone (1-34) increases the density of rat cancellous bone in a bone chamber: a doseresponse study. *J Bone Joint Surg [Br]* 2000;82-B:138-41.
10. Seth AK, De La Garza M, Fang RCi Hong SJ, Galiano RD. Excisional wound healing is delayed in a murine model of chronic kidney disease. *PloS One.* 8(3):e59979, 2013.
11. Allen HL, Wase A, Bear WT. Indomethacin and aspirin: effect of nonsteroidal anti-inflammatory agents on the rate of fracture repair in the rat. *Acta Orthop Scand* 51:595-600, 1980.

12. Kılıçoğlu SS, Mikroskopi Düzeyinde Kırık İyileşmesi. Ankara üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası Cilt 55, Sayı 2, 2002
13. Racanicchi IA, Oliveira AB, Berbieri RL, Delle H, Duerta Ida S, Leme PL. Experimental models of renal dysfunction in female rats. Functional and histological aspects after unilateral nephrectomy or ligation of right renal vein with kidney preservation. *Acta Cir Bras.* 30.824-830, 2015
14. Seth AK, De La Garza M, Fang RC, Hong SJ, Galiano RD. Excisional wound healing is delayed in a murine model of chronic kidney disease. *PLoS One.* 8(3): e59979, 2013
15. Fredrik Agholme,¹ Brandon Macias,¹ Matt Hamang,² Jonathan Lucchesi,² Mary D. Efficacy of a Sclerostin Antibody Compared to a Low Dose of PTH on Metaphyseal Bone Healing Received 19 October 2012; accepted 25 October 2013 Published online 14 November 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/jor.22525
16. Yamane H, Takakura A, Shimadzu Y, Kodama T, Lee J-W, Isogai Y, et al. (2017) Acute development of cortical porosity and endosteal naïve boneformation from the daily but not weekly short-term administration of PTH in rabbit. *PLoS ONE* 12(4):e0175329. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175329>
17. R. Skripitz, P. Aspenberg Implant fixation enhanced by intermittent treatment with parathyroid hormone From Lund University Hospital, Lund, Sweden *J Bone Joint Surg [Br]* 2001;83-B:437-40. Received 4 June 1999; Accepted after revision 28 October 1999
18. Magnus BERNHARDSSON, Olof SANDBERG, and Per ASPENBERG Experimental models for cancellous bone healing in the rat Comparison of drill holes and implanted screws *Acta Orthopaedica* 2015; 86 (6): 745–750
19. Ciara M Murphy,^{1,2} Aaron Schindeler,^{1,2} Laurence C Cantrill,^{1,2} Kathy Mikulec,¹ Lauren Peacock,¹ and David G Little^{1,2} PTH(1-34) Treatment Increases Bisphosphonate Turnover in Fracture Repair in Rats *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol. 30, No. 6, June 2015, pp 1022–1029 DOI: 10.1002/jbmr.2424
20. Naoki Okubo^{1,2,3}, Hiroyoshi Fujiwara², Yoichi MiNaMi^{1,3}, Tatsuya kuNiMOTO^{1,2,3}, Toshihiro HOOkawa^{1,2,3}, Yasuhiro uMeMura¹, Hitoshi iNOkawa¹, Maki asada², ryo Oda², Toshikazu kubO^{2,3}, and kazuhiko Yagi¹ Parathyroid hormone resets the cartilage circadian clock of the organ-cultured murine femur submitted 2014-12-12. accepted 2015-02-13

21. Michael Pensak,¹ Seung-Hyun Hong,² Alex Dukas,¹ Jennifer Bayron,¹ Brian Tinsley,¹ Ashish Jain,³ Amy Tang,⁴ David Rowe,¹ Jay R. Lieberman Combination Therapy With PTH and DBM Cannot Heal a Critical Sized Murine Femoral Defec Received 7 October 2014; accepted 10 March 2015 Published online 14 May 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/jor.22896