T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

PROJE BAŞLIĞI
KİRENOL'ÜN RATLARDA DENEYSEL FEMUR KIRIĞI KAYNAMASI VE WNT/ B-CATENİN YOLAĞI ÜZERİNE ETKİLERİ

Proje No:
TDA-2016-6136

Proje Türü
Kurum Dışı

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Adı Soyadı : İbrahim KARAMAN
Birimi/Bölümü : Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji

Araştırmacının
Adı Soyadı : Serap Doğan
Birimi/Bölümü : Tıp Fakültesi Radyodiagnostik Anabilim Dalı
Araştırmacının
Adı Soyadı : Ali Eray Günay
Birimi/Bölümü : Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji
Araştırmacının
Adı Soyadı : Eren Demirpolat
Birimi/Bölümü : Eczacılık Fak. Farmakoloji Anabilim Dalı

Eylül 2017
KAYSERİ

TEŞEKKÜR: Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi ve TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
ABSTRACT	6
1. GİRİŞ	7
2. GEREÇ ve YÖNTEM	9
3. BULGULAR	21
4. TARTIŞMA	30
5. SONUÇ	33
6. KAYNAKLAR	33

ÖZET

Amaç

Bu çalışmanın amacı ratlarda deneysel olarak oluşturulan femur kırığı üzerine Kirenol'un etkilerini araştırmaktır. Aynı zamanda Kirenol'un olası etki mekanizması "WNT/β – Catenin" yolağı üzerine etkisinin aydınlatılması ve kırık iyileşmesi üzerinde olumlu etkileri bilinen insan kaynaklı "Bone Morphogenetic Protein-2" (rhBMP-2) ile etkinliklerinin kıyaslanması amaçlanmıştır.

Materyal Metod

Bu doğrultuda 8'er rattan oluşan 14 grup (toplam 112 denek) çalışmaya alındı. Sağlam ratlarda alkalen fosfataz (ALP) düzeyinin ölçüldüğü "P grubu" hariç bütün deneklerin sağ femurlarında deneysel kırık oluşturulduktan sonra Krishner teli ile intramedüller olarak fikse edildi. 1. Saat (1 Grup), 10. gün (4 Grup), 21.gün (4 Grup) ve 42. günde (4 Grup) intrakardiak kan örneği alınmasının ardından sakrifikasyon yapılarak sağ femurları çıkarıldı. Bilgisayarlı Tomografi, Direkt grafi ve Histolojik skorlama ve Western Blot yöntemi ile protein ekspresyon analizi yapıldı.

Bulgular

10. gün denek grupları arasında en yüksek Histolojik ve Radyolojik skor 4mg/kg Kirenol uygulanan grupta görüldü. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı görüldü. Western Blot sonuçlarında da Kirenol 4 mg/kg grubunda WNT ve β – Catenin ekspresyonu en fazla artışın görüldüğü grup olmuştur. Ancak 21. gün grupları arasında Kallus hacmi, dansite, histoloji, ALP ve röntgen skorları arasında anlamlı fark görülmemiştir. 42. gün gruplarında 4mg/kg Kirenol ve BMP uygulanan grupların histolojik skorları kontrol grubu ve 2 mg/kg kirenol uygulanan grubun histolojik skorlarından anlamlı olarak yüksek bulunmuştur

Tartışma

Bu bulgular doğrultusunda Kirenol ve BMP'nin kırık iyileşmesi basamaklarını hızlandırdığı, erken dönemde kırık iyileşmesinin pik yaptığı ancak ilerleyen günlerde kaynamanın tamamlanmaya yaklaşmasıyla bu aktivasyonun yavaşladığı ve kontrol grubu ile aynı kaynama skorlarına ulaştığı düşünülmektedir. Bunun sonucunda Kirenol'ün klinikte kullanımıyla kırık kaynamasının daha kısa sürede olabileceğini düşünmekteyiz.

Abstract

Aim

The aim of this study is to investigate the effects of Kirenol on fructure healing. Furthermore, the effect of Kirenol on the possible action of mechanism namely “WNT/β – Catenin” pathway and the comparision of its efficacy in fracture healing with a known progenitor recombinant human Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2) will be investigated.

Material – Method

In this direction, 14 groups (total 112 subjects) consisting of 8 rats were taken into the study. Experimental fractures were formed in the right femurs of all subjects except "P group" where alkaline phosphatase levels in healthy rats were measured, and then fixed as intramedullary with krishner teli. At the 1st hour(1 Group), 10th day(4 Group), 21st day (4 Group) and 42th day(4 Group), intracardiac blood sample was taken and the right femurs were removed by sacrification. Protein expression analysis was performed by computerized tomography, direct x-ray and histological scoring and Western Blot method.

Results

The highest Histological and Radiological score among the 10th day sacficated test group was seen in the group receiving 4mg / kg Kirenol. This difference was statistically significant. In the Western Blot results, Kirenol showed the greatest increase in WNT and β-Catenin expression in the 4 mg / kg 10th day group. However, there was no significant difference between callus volume, dansity, histology, ALP, and x-ray scores among 21 day old groups. Histologic scores of groups treated with 4 mg / kg Kirenol and BMP at 42nd day were significantly higher than histologic scores of the control group and 2 mg / kg Kirenol group

Conclusion

In the direction of these findings, it is thought that Kirenol and BMP got early recovery of fracture healing stages, but in the following days with the completion of healing, this activation slowed down and reached the same union scores as the control group. It suggests that fractures that are expected to boil for a long time when applied to human bone fractures can be shortened in a short time.

Sonuç Raporu Ana Metni

GİRİŞ

Kirenol, Herba Siegesbeckia bitkisinden elde edilen bir diterpenoidtir. Daha önce yapılan çalışmalarda Kirenol'un antiinflamatuar, antiadipojenik, immünregülatör, antioksidan, antiartritik ve yara iyileşmesi üzerine olumlu etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (1-5). Yapılan başka bir hücre kültürü çalışmasında osteoblastik hücreler üzerinde olumlu etkisinin olduğu gösterilmiştir (6).

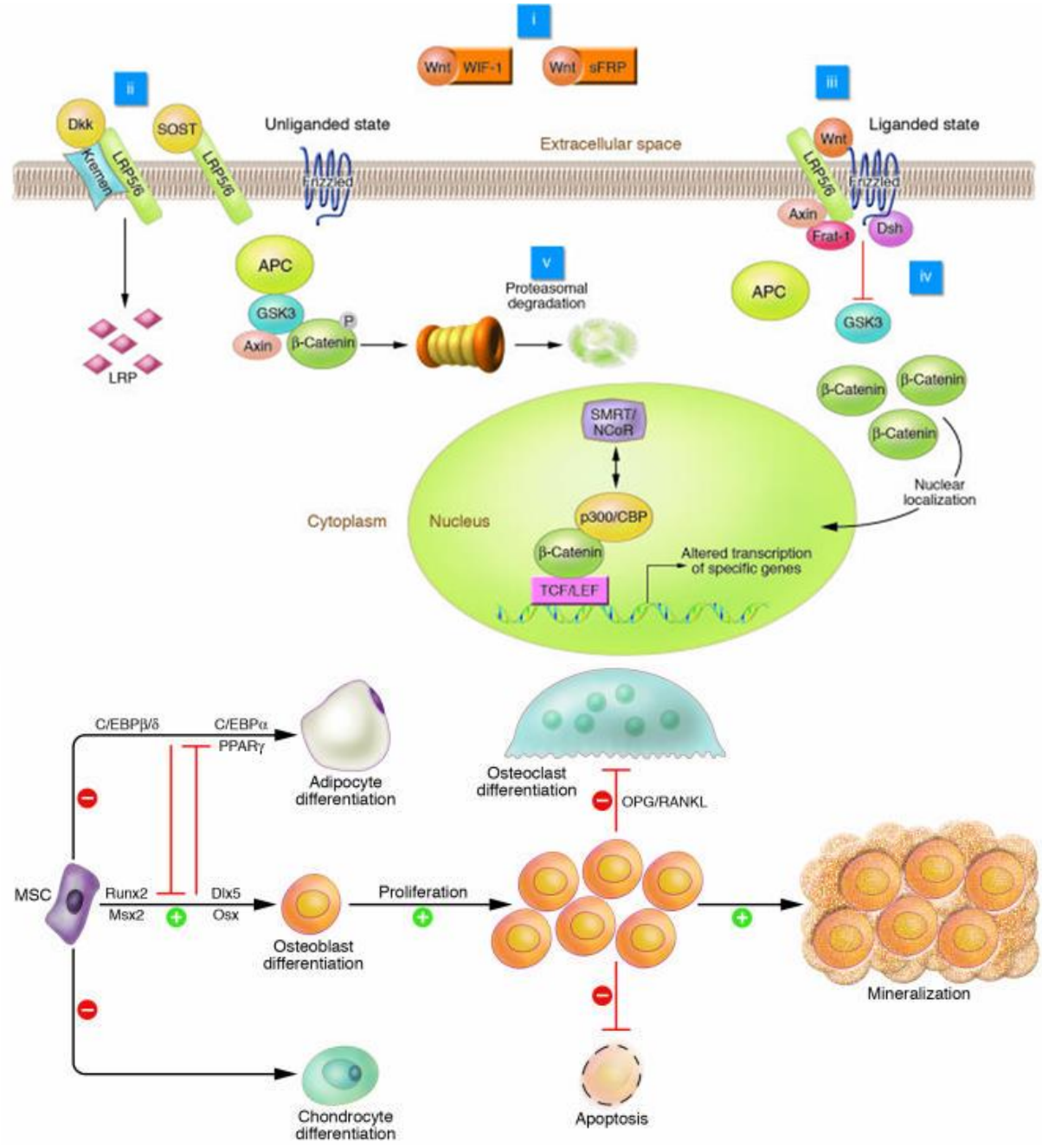
Gün geçtikçe kırıklar daha iyi tanınmakta, ortopedik girişimler ve tıbbi teknolojideki hızlı ilerleme ile yeni cerrahi yöntemler geliştirilmektedir. Ancak bunlara rağmen bazı kırıkların iyileşmesi istenildiği gibi olmamakta, iyileşme zamanında uzama ve bazen de kaynamama görülebilmekte ve bu durumlar kişilerin işe ve günlük hayata donüş sürelerini uzatırken implant yetmezliği riskini artırmaktadır. Bu durum kırık iyileşmesinde kaynama süresini kısaltabilecek ve/veya kaynama oranını yükseltebilecek tedavilere ihtiyaç doğurmaktadır.

Kırık iyileşmesi doğru zamanda ve doğru anatomik lokalizasyonda kırık parçaların toplanmasını ve sonra uygun enzimlerin salınışını gerektiren kompleks bir süreçtir. Birbirinden tam ayrılamayan inflamasyon, proliferasyon ve remodelling olmak üzere 3 dönemde incelenir. Bu süreçte lokal (kemik tipi, lokalizasyon, radyasyon, denervasyon, dolaşım, parakrin etkiler vb) ve sistemik (yaş, ek hastalık, beslenme, hormonal vb) pek çok faktör kaynama üzerine etki etmektedir. Kırık iyileşmesi sırasında oluşabilecek komplikasyonların en sık görüldüğü dönem ilk ossifikasyonun oluştuğu ameliyat sonrası birinci aydır (7). Bu dönemde uygulanacak olan tedavinin olumlu ya da olumsuz etkisi yapılan cerrahi işlemin başarısını ve kırığın akıbetini doğrudan etkileyecektir. Yan tesiri en az ve etkinliği tanımlanmış bileşikler üzerinden tedavi başarısını ve kırık iyileşmesini olumlu yönde etkilemek mümkündür. Bu nedenle gerçekleştirilmesi planlanan bu çalışma ile bu hedefe yönelik doğal bir madde olan Kirenol tercih edilmiş ve kırık iyileşmesi üzerine etkilerinin ve etki mekanizmasının aydınlatılması amaçlanmıştır.

Wingless Type (WNT) ve Bone Morphogenetic Protein-2(BMP 2) kırık iyileşmesini doğrudan etkileyen 2 proteindir. BMP osteoprogenitör hücre değişimini artırırken Wnt hem proliferasyonu hem de matrix sentezini artırarak kemik iyileşmesi üzerine olumlu etki gösterir. Kirenol ise her iki proteini de aktive eden bir diterpenoidtir (8). MC3T3-E1 ostaoblast hücrelerinde gerçekleştirilen bir çalışmada Kirenol'ün in vitro olarak BMP ve Wnt yolağını aktive ettiği bu nedenle ostaoblastik hücrelerin farklılaşmasını bu mekanizma üzerinde

tetiklediği gösterilmiştir (6). Ancak bu madde ile ilgili kırık iyileşmesindeki in vivo etkileri üzerine henüz herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır.

Wnt, başta β-catenin stabilizasyonu olmak üzere hücre içi olayları etkileyerek, β-catenin'in hücre çekirdeğine transportunu hızlandırarak Lef1/Tcf tarnskripsiyon faktörlerini aktive etmek suretiyle gen ekspresyonunu değiştirmekte ve osteoblastik gelişimi ve fonksiyonu olumlu yönde etkilemektedir (9). Özellikle WNT1/3a'nın osteoblastik hücrelerde hücre çoğalmasını ve uzamasını tetiklediği ve bunun sonucunda alkalen fosfatazı indüklediği daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir. LRP-5 ise kemik remodelling olayında WNT'nin bağlandığı en önemli reseptör olup, bu reseptörün aktivasyonu hücre çekirdeğinde Lef1/Tcf transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu artırmaktadır.



Şekil 1: Canonik WNT/ β – Catenin ve Runx2 yolağı

BMP2 ve WNT, osteoprogenitor aktivitenin başlamasından sorumlu temel proteinlerdir. Bu sistemin aktive olması preostaoblastik hücrelerin çoğalmasından sorumlu proteinler olan RunX2, LRP5, Lef1/TCF sistemini aktive etmek suretiyle matriks olgunlaşmasını ve farklılaşmasını sağlamakta ve preosteoblast hücrelerinin olgun osteoblastik hücrelerine dönüşümünü belirlemektedir (10). O nedenle Wnt ile başlayan bu yolağın indüklenmesi durumunda belirtilen tüm bu proteinlerin aktivasyonu sonucunda olgun osteoblast hücrelerinin oluşumu ve osteositlere dönüşümü artmakta ve hızlanmakta ve bunun in vivo sonucu olarak da kırık iyileşmesi hızlanmaktadır. Bu yolakta GSK3 β, Dickkopfs proteini gibi proteinler ise yolağı inhibe eden ve tümör oluşumunu engelleyen temel mekanizmalardır (11).

Bu çalışmanın amacı Kirenol'ün bu yolak ve kırık kaynaması üzerine etkilerini araştırmaktır.

2. MATERYAL METOD:

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan 12.11.2014 tarih ve 14/142 sayılı onay alındıktan sonra 01.07.2015 – 01.01.2017 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji AD, Radyodiagnostik AD, Deneysel ve Klinik Araştırmalar Merkezi (DEKAM) ve ERÜ Eczacılık Fakültesi araştırma laboratuvalarının imkanları kullanılarak TUBİTAK 3001 proje desteği ile yapıldı.

2.1. Deney Hayvanları ve Cerrahi

Bu çalışmada, ortalama 6 aylık, 112 adet Wistar Albino cinsi rat (DEKAM) kullanıldı. Deney süresince 10–14 saat aydınlık/ karanlık döngüsünde normal oda şartlarında tutulan denekler standart pellet yem ve musluk suyu ile beslendi. Cerrahi öncesinde anestezi için 3 mg/kg Ksilazin Hidroklorür (Rompun©, Bayer, Türkiye) ile 90 mg/kg Ketamin Hidroklorür (Ketalar©, Eczacıbası, Türkiye) intraperitoneal olarak uygulandı. Deneklerin sol alt ekstremitesi traş edildikten sonra Povidon İyodür ile boyandı ve ameliyat sahası açık kalacak şekilde steril örtüler ile örtüldü. "P" grubu hariç tüm ratlara proksimale doğru uzatılan standart diz orta hat insizyonu ile yaklasıldı. Cilt-cilt altı doku geçildikten sonra median parapatellar insizyonla diz eklemine girildi. Daha sonra tüm ratların intermusküler planlar arasından girilerek femur 1/3 orta kısımları ortaya çıkarıldı; elektrikli testere yardımıyla osteotomize edildi. Kırık sonrası ratların femurları retrograd olarak 1,5 mm'lik Kirshner (Kr) telleri ile tespit edildi (A grubu hariç). rhBMP-2 uygulanacak "E, K ve O" gruplarına 30 µg rhBMP-2 emdirilmiş 10 x 10 x 10 mm'lik spongostan (Clinosponge®, Yücel Medikal, Türkiye) kırık hattını çevreleyecek şekilde

örtüldü (12). Tespit sonrası kırık hattı ve insizyon sahası %0,09'luk NaCl ile yıkandı. Yıkama sonrası sıra ile patellar tendon ve cilt 3/0 keskin iğneli Vicryl (Ethicon®, Johnson & Johnson) ile sütüre edildi. Yara yeri pansumanı yapıldı. Ratlar anestezi sonrası derlenme süresi boyunca ayrı ortamlarda tutuldular. Derlenme sonrasında operasyon öncesi yerlerine koyuldu. Ratlar rastgele 8'er denekli 14 gruba ayrıldı (Tablo 1). Bütün cerrahi işlemler ve cerrahi sonrası takip aynı ekip tarafından yapıldı.

Tablo 1. Grupların isimlendirilmesi

	1. Saat	**10. Gün**	**21. Gün**	**42. Gün**	**0**
Kontrol	A Grubu = 8 Kırık sonrası 1. saatte ALP ve Western Blot analiz	B Grubu = 8	F Grubu = 7	L Grubu = 7	P Grubu = 8 Sağlam ratlar ALP ve Western Blot analiz
Kirenol 2 mg/kg		C Grubu = 8	G Grubu = 8	M Grubu = 8	
Kirenol 4mg/kg		D Grubu = 8	H Grubu = 8	N Grubu = 8	
BMP - 2		E Grubu = 8	K Grubu = 8	O Grubu = 8	

Sağlam deneklerden intrakardiak alınan kan örneklerinde alkalen fosfataz ölçülen grup "P", kırık oluşturulduktan 1 saat sonra ALP ölçümü için kan alınan grup "A" olarak isimlendirildi.

24 adet deneğe kırık tespiti sonrası 1. günde başlamak üzere 2 mg/kg Kirenol %100'lük DMSO ile 2/100 oranında karıştırılıp çözüldükten sonra 1/10 oranında SF ile dilüe edilip oral gavaj yoluyla uygulandı. 10. Günde sakrifiye edilen grup "C", 21. günde sakrifiye edilen grup "G", 42. Günde sakrifiye edilen grup da "M" grubu olarak isimlendirildi.

24 adet deneğe kırık tespiti sonrası 1. günde başlamak üzere 4 mg/kg Kirenol %100'lük DMSO ile 1/100 oranında karıştırılıp çözüldükten sonra 1/10 oranında SF ile dilüe edilip oral gavaj ile uygulandı. 10. Günde sakrifiye edilen grup "D", 21. günde sakrifiye edilen grup "H", 42. günde sakrifiye edilen grup da "N grubu" olarak isimlendirildi.

24 adet deneğe 0,04 mg/kg dozunda DMSO 1/10 oranında SF ile dilüe edilip oral gavaj yoluyla uygulandı. Deneklerden 10. Gün sakrifiye edilen grup "B" 21. günde sakrifiye edilen

grup “F”, 42. Günde sakrifiye edilen grup da “L grubu” olarak isimlendirildi. F ve L gruplarından birer denek takip sırasında öldüğü için çalışmadan çıkarıldı.

24 adet deneğe kırık oluşturulmasının ardından 30µg rhBMP2 emdirilmiş 10 x 10 x 10 mm’lik spongostan kırık hattını çevreleyecek şekilde örtüldü. Bu gruplara da Kirenol çözeltisi hazırlamak için kullanılan DMSO 0,04 mg/kg miktarında 1/10 oranında SF ile dilüe edilip oral gavaj yoluyla uygulandı. rhBMP2 uygulanan deneklerden 10. Günde sakrifiye edilen grup “E”, 21. günde sakrifiye edilen grup “K”, 42. Günde sakrifiye edilen grup da “O grubu” olarak isimlendirildi.

Tüm gruplardan sakrifikasyon işlemi öncesinde serum ALP ölçümü için intrakardiak 1 cc kan örneği alındı ve intrakardiak Potasyum enjeksiyonu ile terminasyon yapıldı.

2.2. Radyolojik İnceleme

Sakrifikasyon sonrası deneklerin femurları çıkarıldı. Elde edilen femurların kallus dokuları korunarak 0,5 mm kalınlığında kontrastsız bilgisayarlı tomografi (BT) görüntüleri (Toshiba Aquilion One©, Japonya) elde edildi. Ardından bilgisayar ortamında elde edilen görüntülerde metal artefaktını azaltmak için SEMAR (Single Energy Metal Rtifact Reduction) tekniği kullanılarak tomografi iş istasyonuna (Vitrea, Toshiba Medical Systems) alınan görüntülerden kallus hacmi (mm^3) hesaplandı. Ardından kallus dokusunun en belirgin olduğu kesitten sadece kallusu içine alacak şekilde ilgi alanı çizilerek (ROI) Hounsfield Skorlamasına göre (Hava = - 1000, Su = 0, Kemik = +1000) dansite ölçümü yapıldı.

Spesmenlerin direk grafilerinin elde edilmesi için (Siemens©, Multix C) grup ve sıra numaralarına göre X-Ray kaseti üzerine yerleştirildi. AP ve Lateral görüntüler elde edildi. Bu görüntülerde 4 kortekste (anterior, medial, posterior ve lateral korteksler) kallus oluşumu ve kaynamasına göre Radiographic Union Score of Tibia Fracture (RUST) skorlaması kullanılarak 1 – 3 puan verildi (Tablo 2) (13). Değerlendirmeler bir radyolog ve iki ortopedist tarafından kör olarak iki farklı zamanda yapıldı. Elde edilen “altı” değerlendirme sonucunun ortalaması o deneğin “Röntgen Skoru” sonucu olarak belirlendi.

Tablo 2. RUST skorlama sistemi.

	Kırık hattı belirgin, Kallus oluşumu yok	**Kırık hattı belirgin, Kallus oluşumu var**	**Kırık hattı seçilmiyor.**
Medial Korteks	1 Puan	2 Puan	3 Puan
Lateral Korteks	1 Puan	2 Puan	3 Puan
Anterior Korteks	1 Puan	2 Puan	3 Puan
Posterior Kortex	1 Puan	2 Puan	3 Puan

2.3. Histopatolojik İnceleme

Radyolojik inceleme sonrası spesmenler Hassas kesme cihazına bağlı elmas testere (Exakt 300 CL, Exakt® Apparatbau, Norderstad, Almanya) ile sagital olarak iki eşit parçaya ayrıldı. Lateral parça Western Blot analizi, Medial parça ise Histopatolojik inceleme için ayrıldı. Histopatolojik inceleme için ayrılan kemik dokular 20 gün %4'lük formaldehit solüsyonu içinde tutularak tespit edildi. Daha sonra %10'luk formik asit solüsyonu içinde 15 gün boyunca dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyon işleminden sonra rutin histolojik doku takip aşamalarında geçirilen dokular parafine gömüldü. Parafin bloklardan alınan 5μm'lik kesitlere histopatolojik inceleme için Masson'un üçlü boyaması yapıldı. Kırık iyileşmesinin histolojik olarak incelenmesi Huo ve ark. Tarafından tariflenen skorlamaya göre yapıldı(14).

Tablo 3. Huo ve ark. kırık bölgesi histolojik skorlama sistemi

Skor	Kırık Bölgesi Histolojik Bulgular
1	Fibröz Doku
2	Ağırlıklı Fibröz Doku ve Az Oranda Kıkırdak Doku
3	Eşit Miktarda Fibröz Doku ve Kıkırdak Doku
4	Kıkırdak Doku
5	Ağırlıklı Olarak Kıkırdak ve Az Oranda İmmatür Kemik
6	Eşit Oranda Kıkırdak ve İmmatür Kemik
7	Ağırlıklı Olarak İmmatür Kemik ve Az Oranda Kıkırdak
8	Tamamen İmmatür Kemik
9	İmmatür Kemik ve Az Oranda Matür Kemik
10	Matür (Lameller) Kemik

2.4. Alkalen Fosfataz Ölçümü

İntrakardiak yolla alınan 1 cc kan örneği 3000 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serumlar -80^{o}C soğutma ünitesinde muhafaza edildi. Numuneler çalışılacağı gün soğutma ünitesinden alındı ve çözülerek buz içinde bekletildi. ALP düzeyleri kolorimetrik esasa dayalı olarak çalışan ticari kitle (Abcam ab 83369) kit protokolüne göre uygun olarak gerçekleştirildi. Kit serum ve diğer biyolojik numunelerde bulunan ALP' nin fosfataz aktivitesine bağlı olarak p-nitrofenil fosfatın (p-nPP) defosforile edilerek ortamda oluşan renkli p-nitrofenolün (p-nP) 405 nm' de maksimum absorbans vermesine dayalı bir şekilde ölçümünü gerçekleştirmektedir. ALP' nin enzimatik aktivitesini gösterebilmesi için kit içinden çıkan deney tamponu ile uygun reaksiyon ortamı sağlanmıştır. ALP miktarı standart numune kuyuları kullanılarak p-nPP' ye karşı absorbans grafiğinden türetilen denklemde bilinmeyen numunelerin absorbansı kullanılarak Şekil 2' daki formüle göre hesaplanmış ve ALP

aktivitesi U/ml üzerinden ifade edilmektedir. Ölçümler sırasında düz tabanlı şeffaf 96 kuyucuklu plate kullanılmıştır. Kit içeriğine Tablo 4'de yer verilmiştir.

Şekil 2. ALP aktivitesi hesabı

$$\text{ALP aktivitesi (U/ml)} = \frac{A}{V} \times t$$

A: Standart eğriden elde edilen ve bilinmeyen numune kuyusundaki p-nP miktarı, µmol
V: Bilinmeyen numune kuyusuna konulan plazma hacmi, ml
T: İnkübasyon süresi, dk

Tablo 4. ALP kiti içeriği ve reaktiflerin hazırlanması

ALP Kiti Abcam ab 83369	
Kit içindeki reaktif	**Hazırlama ve diğer bilgiler**
p-nPP fosfataz enzimi için substrat tableti	100 reaksiyon için 5,4 ml deney tamponunda 2 tablet çözülür ve 5 mM' lık solüsyon elde edilir. Taze olarak hazırlanır, buzda 12 sa boyunca stabildir.
ALP enzimi	1 ml deney tamponunda çözülür. Çözüldükten sonra +4°C' de 2 ay boyunca stabildir. Dondurulmamalıdır. İhtiyaç kadar porsiyonlanabilir.
Stop solüsyonu	Kullanıma hazırdır, -20 °C' de muhafaza edilir.
ALP deney tamponu	Kullanıma hazırdır, -20 °C' de muhafaza edilir.

Standart numune kuyularına eşit miktarda enzim ve değişen konsantrasyonlarda olmak üzere p-nPP eklenmiştir (Tablo 5). Bilinmeyen numuneler için sinyalin çok yüksek gelmemesi için numuneler dilüe edilmeden 5 µL olacak şekilde ortama eklenmişler ve sabit miktarda p-nPP eklenmiştir. Stop solüsyonu ile reaksiyon sonlandırılmış ve kuyulardaki renkli p-nP absorbansı 405 nm' de mikroplate okuyucuda (Biotek Synergy HT) ölçülmüştür. Standart ve bilinmeyen numune kuyularının içeriğine Tablo 6'da yer verilmiş ve tüm numuneler iki tekrarlı olarak ölçülmüştür.

Tablo 5. ALP kiti standart numuneler için p-nPP hazırlanması

Standart no	**p-nPP hacmi (1mM)**	**Deney tamponu hacmi (µL)**	**Standart numune kuyusuna eklenen hacim (µL)**	**Deney sonunda kuyudaki son p-nPP konsantrasyonu (nmol)**
1	0	360	120	0
2	12	348	120	4

3	24	336	120	8
4	36	324	120	12
5	48	312	120	16
6	60	300	120	20

Tablo 6. Bilinmeyen ve standart numune kuyularının içeriği

Standart numune kuyusu içeriği	**Bilinmeyen numune kuyuları içeriği**
0,4,8,12,16,20 nmol p-nPP içerecek şekilde kuyulara 120 uL p-nPP ve deney tamponu karışımı	75 uL deney tamponu
Tüm kuyulara 10 uL ALP enzimi	5 uL plazma
Plate çalkalayıcıda 25 ^{o}C' de 60 dk boyunca inkübasyon	50 uL 1 mM p-nPP (Kitte yer alan 5mM p-nPP konulması tavsiyesi yerine sinyalin çok yüksek çıkmasını engellemek için ortama dilüe edilerek konulmuştur)
Tüm kuyulara 20 uL stop solüsyonu	Plate çalkalayıcıda (Biosan PST 60 HL plus) 25 ^{o}C' de 60 dk boyunca inkübasyon
405 nm' de absorbans ölçümü	Tüm kuyulara 20 uL stop solüsyonu

2.5. Western Blot Analizi

2.5.1. Protein İzolasyon Çözeltisinin Hazırlanması

Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) lizis tamponu ve proteaz inhibitörleri kullanılarak protein izolasyon çözeltisi hazırlanmıştır. Protein çözeltisi içinde bulunan yüzey aktif maddeler proteinlerin eldesini sağlarken, ortamda bulunan proteazlar tarafından proteinlerin parçalanmasını ise proteaz inhibitörleri önlemektedir. Lizis tamponunun her 10 ml' si için 1 adet EDTA içermeyen Roche complete mini proteaz inhibitör kokteyli (Roche 11836157001) tableti kullanılmıştır ve bu kokteyle fenilmetilsülfonil (Sigma P7626), aprotinin (Applichem A2132), leupeptin (Applichem A2183), pepstatin A (Applichem A2205) gibi diğer proteaz inhibitörleri katılmıştır. Tamponun tam içeriği tablo 7'de ve proteaz inhibitör kokteyle ek olarak

kullanılan proteaz inhibitörleri tablo 8'de yer almaktadır. Katı maddeler distile su içinde çözülmüş,triton %1' lik çözeltisi konulmuş ve distile su ile 100 ml' ye tamamlanmıştır. Çalışma günü kullanılacak miktara göre ripa lizis tamponunun 10 ml' sinde 1 tablet çözülmüş ve diğer proteaz inhibitörleri ortama eklenmiştir.

Tablo 7. RIPA lizis tamponu içeriği

Ripa lizis tamponu (1X için 100 ml için)	
Tris HCl 50 mM pH 7,4 ma:157,76 g/mol (Sigma T3253)	787 mg
NaCl 150 mM ma: 58,44 g/mol (Sigma S7653)	876 mg
Triton %1 a/h sıvı distile su içinde (Sigma T8787)	1 ml (20)
SDS %0,1 a/H katı (Sigma L3771)	100 mg
Sodyum deoksikolat %0,5 katı (Sigma D6750)	500 mg
Distile su	100 ml' ye tamamlanır

Tablo 8. Roche protease inibitor kokteyline ek olarak ortama eklenen proteaz inhibitörleri

Diğer Proteaz inhibitörleri	**Stok Konsantrasyon ve Çözücü**	**Lizis Tamponundaki Çalışma Konsantrasyonu**
PMSF	100 mM - metanol	1 mM
Aprotinin	200 µg/ml - distile su	2 µg/ml
Leupeptin	1 mg/ml - distile su	10 µg/ml
Pepstatin A	100 µg/ml - metanol	1 µg/ml

2.5.2. Kemiklerin Homojenizasyonu Ve Protein Ekstraksiyonu

Kemik numuneleri -80^{o}C soğutma ünitesinden alınarak hassas terazide tartıldılar ve kemik dokusunun her 100 mg' ı başına 500 µL protein izolasyon çözeltisi kullanılarak homojenizasyon işlemine geçildi. Kemik dokusu buz altında soğuk bir ortamda öncelikle 1dk kadar homojenizatör (IKA T25 Ultra turrax) ile parçalandı ve hemen sonikasyonla (Bondelin Sonoplus HD 2070) 3 sefer 10 sn boyunca yüksek şiddette sonike edildiler. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. İşlemler sonrası köpüren karışım buz içinde soğuk ortamda tutularak köpüğün kaybolması için beklendi. Bu aşamadan sonra tüp içeriğinin tamamı 2 ml' lik santrifüj tüplerine alındı ve +4^{o}C' de 15000 rpm' de 15 dk boyunca santrifüj (Thermoscientific SL 16R) edildi. Hücre artıklarını içeren pellet atılıp, protein içeren süpernatant total protein konsantrasyonunu belirlemek için temiz ependorflara porsiyonlandı.

2.5.3. Total Protein Konsantrasyonunun Ölçülmesi

Kemik dokudan elde edilen protein karışımının total protein konsantrasyonu bisinkoninik asit (BCA) yöntemiyle BCA protein deney kiti kullanılarak (Thermoscientific 23225) ölçülmüştür. Yöntem alkali ortamda Cu^{+2}' nin Cu^{+1}' e ortamda bulunan proteinler tarafından indirgenmesi esasına dayanan biüret reaksiyonu ile çalışmaktadır. İndirgenmiş bir bakır iyonunun iki bisinkoninik asit molekülü ile şelasyonu sonucunda ortamda suda çözünebilen mor renkli bir ürün oluşmakla birlikte, bu ürün 562 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermektedir. Analiz için standart numuneler sığır serum albumini (BSA) (Sigma A2153) kullanılarak 1µg/µL, 2 µg/µL, 4 µg/µL, 8 µg/µL ve 16 µg/µL konsantrasyonda olacak şekilde distile suda çözülerek hazırlanmıştır. Standart numunelerin total protein düzeyleri ölçülmüş ve konsantrasyona karşılık absorbans grafiğinden elde edilen doğru denklemi kullanılarak bilinmeyen numunelerin absorbans verisi ile total protein düzeyleri hesaplanmıştır.

Ölçülecek numune sayısına bağlı olarak kit içinden çıkan A reaktifi 50 kısım ve B reaktifi 1 kısım oranda olacak şekilde birbiriyle santrifüj tüpü içinde karıştırılmıştır. Kit içeriğine tablo 9' dan ulaşılabilir. A-B karışımı 200 µL olacak şekilde 96 kuyucuklu plateye dağıtılmış ve üzerine kemik dokudan elde edilen protein karışımından 25 µL konulmuştur. Plate oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildikten sonra 562 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüştür. Numunelerin protein konsantrasyonu sonuçları kullanılarak western blot jelinin her kuyusuna eşit miktarda protein karışımı yüklenmiştir.

Tablo 9. BCA kiti içeriği

Thermoscientific 23225 BCA Kiti	
Kit içindeki reaktif	**Hazırlama ve diğer bilgiler**
A reaktifi, sodyum karbonat, sodyum bikarbonat, bisinkoninik asit, sodyum tartarat, sodyum hidroksit	500 ml, kullanıma hazır
B reaktifi, %4 kuprik sülfat	25 ml, kullanıma hazır

2.5.4. Western Blot ile Proteinlerin Analizi

Western blot yöntemi ile protein karışımı elektroforezle birbirinden ayrıştırılır, bir membrana aktarılır ve analizi yapılacak proteinlere özgü antikorlarla işaretlenerek görüntülenirler. Temelde yarı kantitatif bir metoddur ve yöntem, aynı jelde bulunan numunelerden elde edilen sinyalin birbiriyle kıyaslanması sonucunda protein miktarının nasıl değiştiği konusunda fikir sahibi olunmasını sağlar. Yöntemin temel basamaklarını jel dökme, protein numunelerini jele yüklenecek şekilde hazırlama, elektroforez, transfer, blokaj, primer ve sekonder antikorla muamele etme, görüntüleme ve elde edilen sinyalin yazılımla analizi oluşturmaktadır. Çalışmamızda Wnt3a yolağında görevli β-catenin, LRP5, Wnt3a, RUNX-2, TCF1, LEF1

proteinlerinin düzeylerine bakılmıştır ve housekeeping protein olarak GAPDH kullanılmıştır. Deneyler Biorad' ın miniprotean tetracell sistemi ile yürütülmüştür.

2.5.5. Jel Dökme

Proteinlerin yürütülmesinde sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit (SDS-PAGE) jel sistemi kullanılmıştır. β-catenin (92 kDa), Wnt3a (42 kDa), RUNX-2 (55 kDa), TCF1 (28-52 kDa), LEF-1 (25-58 kDa) proteinleri için %10' luk ayırıcı jel; LRP5 (200 kDa) için %7' lik ayırıcı jel kullanılmıştır. Her iki jel sistemi için de %5' lik yığınlayıcı jel dökülmüştür. Jel içeriklerine Tablo 10'dan ulaşılabilir.

Tablo 10. Yığınlama ve ayırıcı jel formülleri

Jel parçası	Distile su	%30 akrilamid/bis akrilamid çözeltisi	Jel tamponu	%10 SDS çözeltisi
%5 yığınlayıcı jel	5,7 ml	1,7 ml	2,5 ml	0,1 ml
%7 ayırıcı jel	5,1 ml	2,3 ml	2,5 ml	0,1 ml
%10 ayırıcı jel	4,1 ml	3,3 ml	2,5 ml	0,1 ml

Jel tamponu	**Polimeriazasyon için kullanılan çözeltiler**
Ayırıcı jel: 1,5 M Tris-HCl pH 8.8 Yığınlayıcı jel: 0,5 M Tris-HCl pH 6.8	Ayırıcı jel: 50 µL %10 amonyum persülfat (APS Sigma A3678), 5 µL tetrametiletilendiamin (TEMED Sigma T9283) Yığınlayıcı jel: 50 µL %10 amonyum persülfat (APS), 10 µL tetrametiletilendiamin (TEMED)

Jeller deneyin yapılacağı gün taze olarak hazırlanmış ve aynı gün içinde bekletilmeden kullanılmıştır. Ayırıcı jelin yüzeyini düzlemek ve hava ile temasını kesmek için 1-butanol (Sigma B7906) kullanılmıştır. Jel dökme işlemi tamamlandıktan sonra daha önceden total protein konsantrasyonu belirlenmiş olan kemik homojenatından jele yüklenmek üzere bir sonraki alt başlıkta bahsedilen örnek hazırlama aşamasına geçilmiştir.

2.5.6. Protein Numunelerinin Jele Yüklenmek İçin Hazırlanması

Proteinlerin denatüre edilerek düzleştirilmesi ve elektroforez işlemi sırasında negatif yükle yüklenerek elektriksel akım altında jel içindeki hareketlerinin sağlanması için kemik homojenatı Laemmli örnek yükleme tamponu ile karıştırılmıştır. Her kemik homojenatından 40 µg protein karışımı içerecek hacimde numune alınmış ve 6x konsantrasyondaki Laemmli örnek yükleme tamponu 1x' e düşürülecek şekilde birbiriyle karıştırılıp 10 dk boyunca 95^{o}C' de ependorf ısıtıcıda (Bioer) bekletilmiştir. Ependorf içindeki karışım buza gömülerek soğutulmuş ve dipte toplanarak (Gilson GmC Lab) jele yüklenmeye hazır hale getirilmiştir. Laemmli örnek yükleme tamponu içeriğine Tablo 11' de yer verilmiştir. Laemmli tamponu 6X hazırlandıktan sonra -20^{o}C' de porsiyonlanarak saklanmıştır, kemik homojenatlarıyla karıştırılacağı zaman taze olarak içine β-merkaptoetanol (Sigma M6250) %4 olacak şekilde Laemmli tamponuna eklenmiştir.

Tablo 11. Laemmli örnek yükleme tamponu içeriği

Laemmli tamponu (6X)	
Madde	**Miktarı**
0,5 M Tris-HCl pH:6,8	7 ml
Gliserol (Sigma G5516)	3,6 ml
SDS (Sigma L3771)	1 g
Bromofenol mavisi (Sigma B0126)	1,2 mg

2.5.7. Elektroforez ve Transfer

Protein molekül ağırlığı başına uygun olarak dökülen jeller elektroforez aparatı içine yerleştirilmiş ve Tablo 12' de içeriği verilen elektroforez çözeltisi konulduktan sonra homojenatlar yığınlama jeli kuyularına yüklenmiştir. 200 V sabit akım altında elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir.

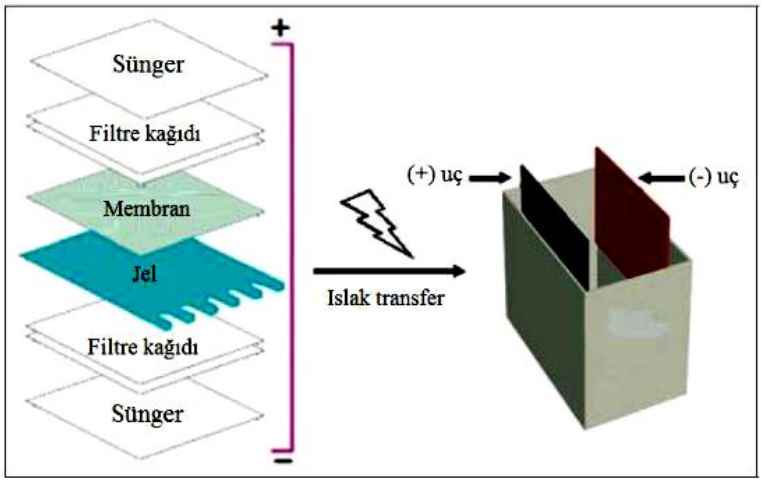
100 ml 10X konsantrasyondaki elektroforez çözeltisine %10 SDS çözeltisinden 10 ml konulmuş ve 1L' ye distile su ile tamamlanmıştır. 1X konsantrasyondaki SDS içeren elektroforez çözeltisi ise western blot tankına dökülmüştür.

Tablo 12. Elektroforez çözeltisinin hazırlanışı

Elektroforez çözeltisi (10X) 200 ml için	
Madde	**Miktarı**
Tris bazı (Sigma T-6066)	6,055 g
Glisin (Sigma G-8898)	28.82
Distile su	200ml' ye tamamlayacak şekilde

Elektroforez işlemi sonrasında jeller cam aparatlardan çıkarılmış ve transfer aparatı içinde filtre kağıdı, sünger, Poliviniliden Florid (PVDF) (Bio Rad 162-01777) membran sandviç şeklinde akım yönüne göre Şekil 3' deki gibi yerleştirilmiştir. Tank içerisine transfer çözeltisi konulmuştur. Transfer çözeltisi 100 ml 10X elektroforez çözeltisine 150 ml metanol eklenip distile su ile 1L' ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Transfer işleminde ısınma problemini önlemek için tank buz içine gömülmüştür ve 225 mA akım altında (Biorad PowerPac Basic) 2 saat boyunca transfer işlemi gerçekleştirilmiştir.

Şekil 3. Transfer aparatı sandviç modeli



2.5.8. Blokaj, Primer ve Sekonder Antikorla İşaretleme

PVDF membran, buffered saline with tween 20 (TBS-T) (Sigma P1379) çözücü olarak kullanılarak hazırlanmış %5 yağsız süt tozu (Sigma 70166) içinde bir saat boyunca çalkalayıcı (IKA KS 130 Basic) üzerinde oda sıcaklığında bloke edilmiştir. Blokaj sonrası tablo 13' te verilen primer antikorlarla analizi yapılan proteinler bir gece boyunca soğuk odada inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda primer antikorlar membrandan uzaklaştırılmış ve hedef proteinlere bağlanmamış olan primer antikoru uzaklaştırmak için membran üç kez TBS-T ile 15 dakika boyunca yıkanmıştır. Membran oda sıcaklığında sekonder antikorla beraber iki saat inkübe edildikten sonra primer antikora bağlanmamış olan sekonder antikoru ortamdan uzaklaştırmak için üç kez TBS-T ile 15 dakika boyunca yıkama işlemi yapılmıştır. Membran yüzeyine ışıma şiddetini ayarlayacak şekilde enhanced chemiluminescence (ECL) (Bioexpress Advansta E-1119-20) çözeltisi uygulanmıştır. Membrandaki ışıma karanlık odada X-Ray filmlerine aktarıldıktan sonra developer (Kodak 8751752) ve fixer (Kodak 1213677) çözeltileriyle banyo edilmiştir. Röntgen filmindeki (Thermoscientific 34090) sinyallerin analizi Image J 1.50i programı ile hesaplanmıştır. Örnek hesap görüntüsüne Şekil 4' te yer verilmiştir.

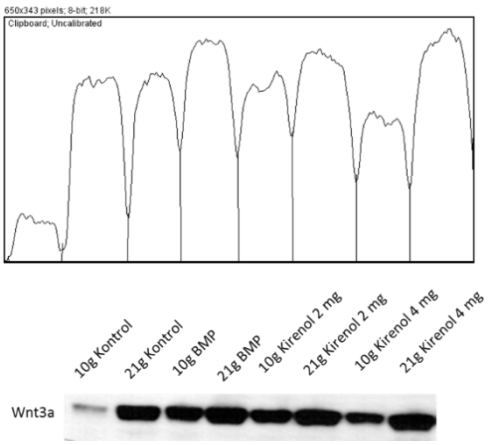
Bu uygulamalar 42. gün grupları laboratuvarda santrifüj sırasında zayi olduğu için L, M, N ve O gruplarına yapılamadı.

Tablo 13. Antikor hazırlanışı hakkında

Antikor hazırlanışı		
Primer antikor		
Antikor tipi	**Katalog no**	**Çalışma konsantrasyonu**
Rabbit β-catenin mAb	Cell signalling 9587	1:1000

Rabbit Wnt3a mAb	Cell signalling 2721	1:1000
Rabbit RUNX-2 mAb	Cell signalling 2556	1:1000
Rabbit TCF1 mAb	Cell signalling 2206	1:1000
Rabbit LEF-1 mAb	Cell signalling 2286	1:1000
Rabbit GAPDH mAb	Cell signalling 2118	1:1000
Sekonder antikor		
Goat Anti rabbit IgG HRP linkted antibody	Cell signalling 7074	1:1000

Şekil 4. Röntgen sinyali ve Image J hesabı örneği



2.6. İstatistiksel Analiz

Verilerin analiz için SPSS 22.0 programına aktarıldı. Bilgisayar ortamına aktarılan verilen Shapiro Wilks testi ile değerlendirildi ve verilerin normal dağılıma uymadığı kabul edildi. Grupların BT-Kallus Hacmi (BT-KH), BT-Dansite (BT-D), ALP, Histopatolojik Skor ve Röntgen Skorları “Kruskal Wallis (KW)” testi ile karşılaştırıldı. Farkın önemli bulunduğu durumlarda farklı olan grupları belirlemek için “Dunn testi” kullanıldı. Değişkenler arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için “Spearman” korelasyon analizi uygulandı. Nicel veriler aritmetik ortalama ± SD ve ortanca (min-max) olarak gösterildi. Bütün analizlerde $p < 0,05$ değerleri anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

Çalışmada kullanılan ratların ortalama ağırlığı 322,6 ± 33,27 (259 – 418) gr olarak ölçüldü. Bilgisayarlı tomografide kallus dansite ortalaması, ortalama röntgen skoru ve histopatolojik değerlendirme skorları arasında korelasyon anlamlı bulunurken Alkalen fostafaz ve BT Kallus hacmi değerleri arasında korelasyon görülmedi (Tablo 14).

Tablo 14. BT Kallus hacmi, Kallus dansitesi, Ortalama röntgen skoru ve Histolojik değerlendirme skorları ve Alkalen fostafaz değerleri arasında spearman korelasyon analizi.

	BT - KH	**BT - D**	**Histoloji**	**ALP**	**XRAY**
BT – KH	1	-0,049	0,240*	0,105	0,112
BT – D	-0,049	1	0,358***	0,014	0,294**
Histoloji	0,240*	0,358**	1	0,245*	0,476***
ALP	0,105	0,014	0,245*	1	-0,161
XRAY	0,112	0,294**	0,476***	-0,161	1

* p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

Tablo 15'de de görüldüğü gibi 10. gün gruplarının ALP ve BT-KH değerleri arasıda fark anlamlı kabul edilmedi. 4 mg/kg dozda Kirenol verilen grupta en yüksek histopatolojik (6,6) ve röntgen (8,1) skorları elde edilirken; diğer gruplar ile arasındaki fark anlamlı olarak bulunmuştur (p<0,05). rhBMP-2 ve Kirenol 4mg/kg gruplarının kallus dansiteleri de diğer iki gruptan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p<0,05). Bu sonuçlar değerlendirildiğinde Kirenol'ün kaynamayı erken dönemde kontrol grubuna ve rhBMP-2'ye kıyasla artırdığı ve bu artışın doz bağımlı olduğu görülmektedir.

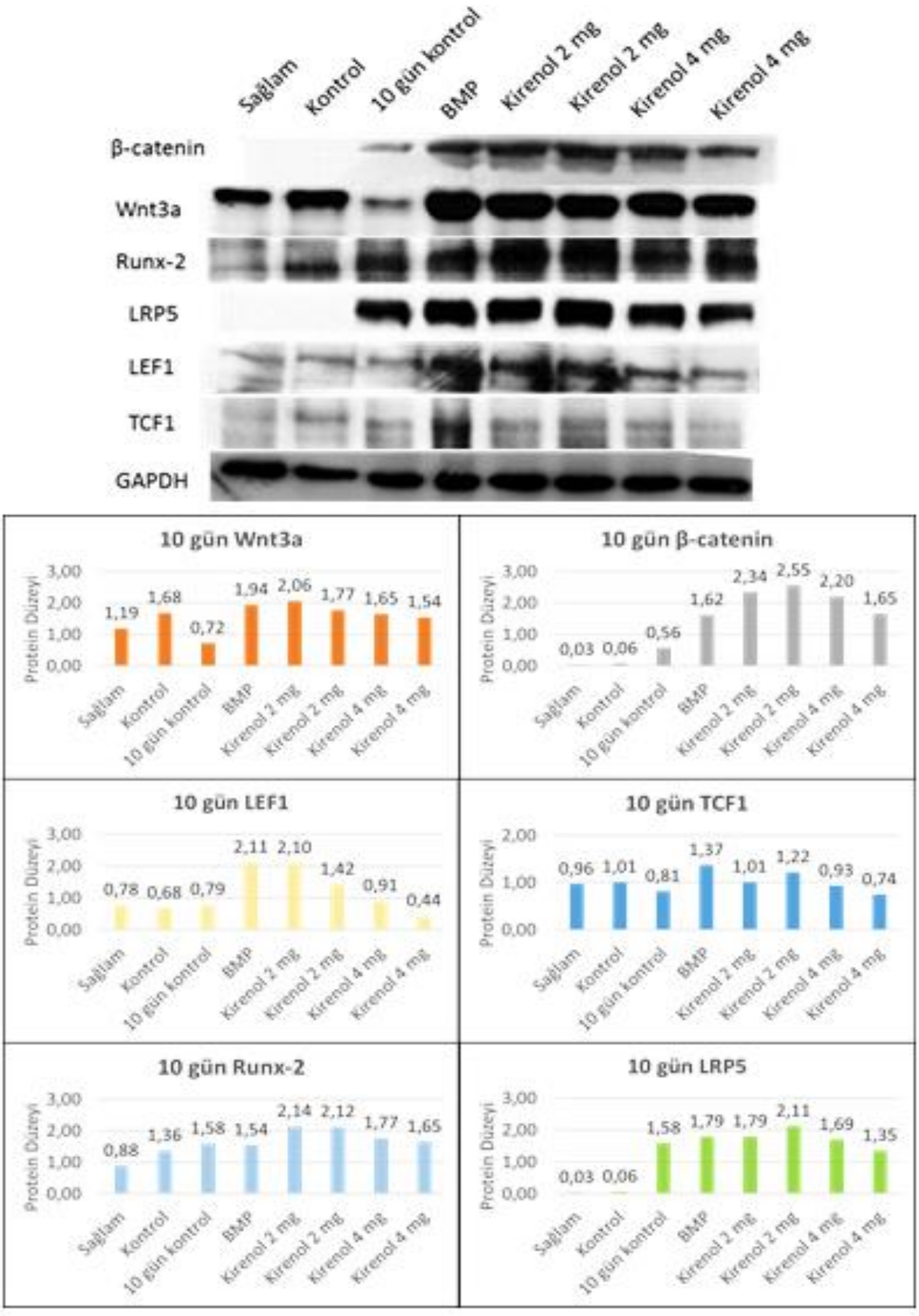
Tablo 15. Onuncu günde sakrifiye edilen deneklerin Kallus Hacmi, Dansite, Histolojik skor, Alkalen Fosfataz ve Röntgen skorlarının karşılaştırılması. Nicel veriler "Aritmetik Ortalama ± SD ve Ortanca (Min–Max)" olarak gösterilmiştir.

Grup	BT - KH	BT – D	Histoloji	ALP	XRAY
B	224,8 ± 90,5	-58,3 ± 92,6 [a]	2,6 ± 2,5 [a]	5,5 ± 1,2	6,3 ± 1,5 [a]
	232,2 (99,9 – 385,9)	-35,7(-190,1 – 61,3)	2,0 (0 – 6)	5,8 (3,8 – 7,4)	6,6 (4,0 – 8,0)
C	203,3 ± 154,6	48,8 ± 81,1 [a]	5,9 ± 0,83 [b,c]	5,5 ± 1,0	7,2 ± 1,6 [a]
	157,1 (53,9 – 526,9)	25,1(-15,7 – 223,0)	6,0(4 – 7)	5,3 (4,3 – 7,3)	7,5 (4,0 – 8,8)
D	229,6 ± 89,2	44,8 ± 48,3 [b]	6,6 ± 0,74 [c]	5,2 ± 1,5	8,1 ± 1,3 [b]
	250,4 (30,7 – 317,2)	41,3(-36,7 – 129,5)	6,5(6 – 8)	5,4 (3,1 – 7,3)	8,3 (5,5 – 10,1)
E	99,3 ± 80,7	44,0 ± 29,5 [b]	4,9 ± 0,83 [a,b]	5,0 ± 1,3	7,1 ± 1,5 [a]
	66,5 (31,5 – 254,1)	45,8 (-12,7 – 84,2)	5,0 (4 – 6)	4,7(3,0 – 7,1)	7,8(4,6 – 8,3)
KW	7,87	7,97	17,74	0,87	7,03
P	0,051	0,47	0,00	0,83	0,07

[a,b,c]: Her kolonda aynı harfi taşımayan gruplar arasındaki fark önemlidir (p<0,05).

Benzer şekilde WNT3a, β- Catenin, Runx-2, LRP-5 ekspresyonlarında Kirenol 4mg/kg uygulanan deneklerde sağlam rat ve kontrol grubuna göre yükselme görüldü. Ancak 2 mg/kg Kirenol uygulanan deneklerde, Kirenol 4mg/kg ve BMP grubundan daha fazla artış görülmüştür. TCF-1/LEF-1 intranükleer proteinler olduğu için değişimleri erken dönemde belirgin farklılık göstermemiştir (Şekil 5).

Şekil 5. 10. gün deneklerinde WNT 3a, β-Catenin, LRP 5, Runx2, TCF ve LEF western blot sonuçları ve Image j analizine ait grafikler
Sonuçlar 10. güne ait deneklerin kendi grupları içinde protein seviyelerinin değişimini göstermektedir.



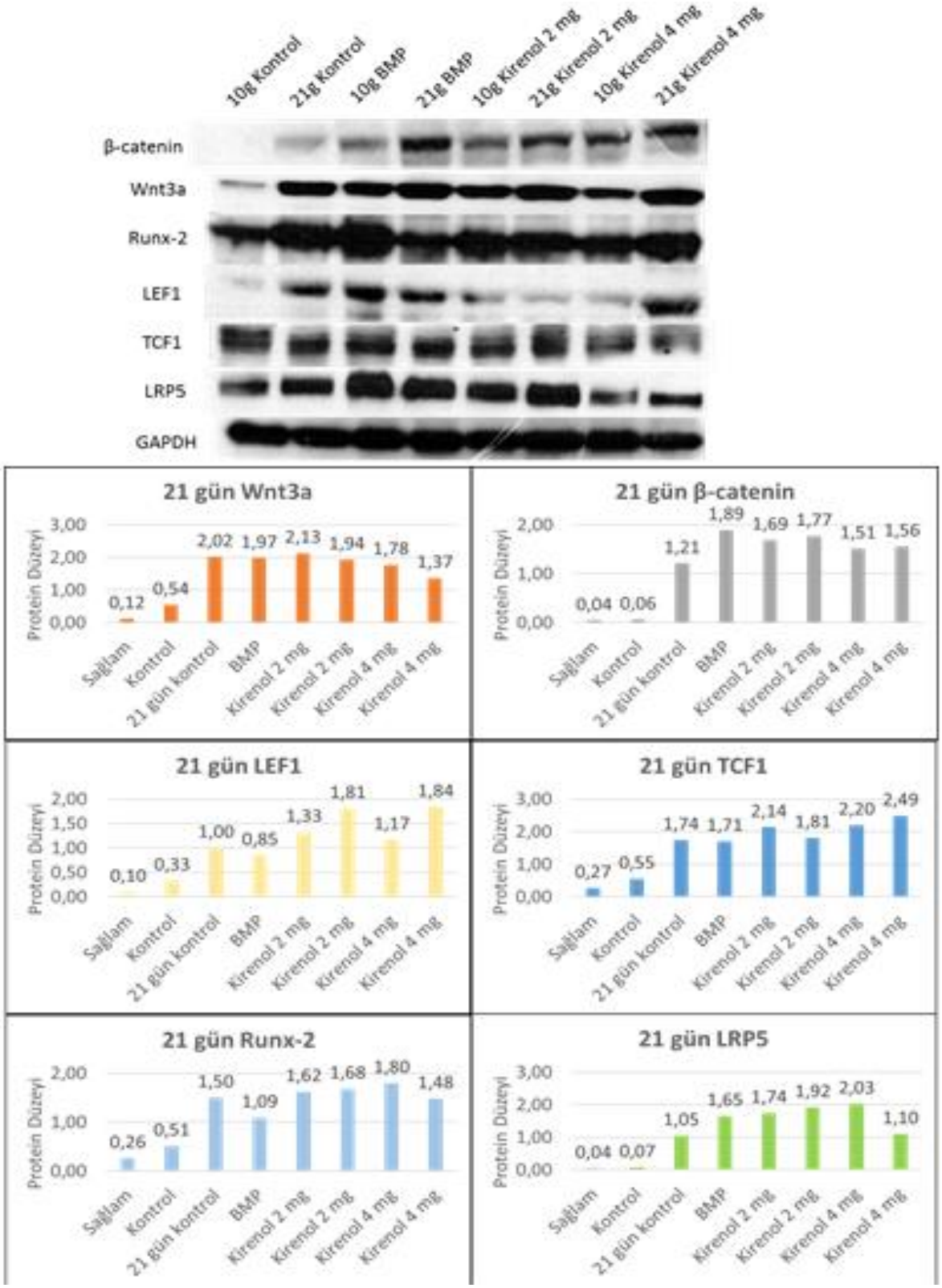
21. gün gruplarında en yüksek histopatolojik skor (7,4) ve röntgen skoru (8,6) Kirenol 4 mg/kg grubunda bulunmuşken aradaki fark istatiksel olarak anlamlı görülmemiştir (Tablo 16).

Tablo 16. Yirmi birinci günde sakrifiye edilen deneklerin Kallus Hacmi, Dansite, Histolojik skor, Alkalen Fosfataz ve Röntgen skorlarının karşılaştırılması. Nicel veriler "Aritmetik Ortalama ± SD ve Ortanca (Min – Max)" olarak gösterilmiştir.

	Kallus Hacmi	Dansite	Histoloji	ALP	Röntgen
F	158,3 ± 87,2	260,0 ± 103,0	6,3 ± 1,4	5,8 ± 1,5	8,0 ± 0,7
	140,0 (65,2 – 277,5)	230,6(147,0 – 411,3)	6,0 (5,0 – 8,0)	5,7 (3,7 – 7,5)	8,0 (7,1 – 8,8)
G	225,3 ± 126,2	244,1 ± 102,1	6,7 ± 0,75	4,9 ± 0,7	8,0 ± 1,1
	243,9 (49,0 – 411,5)	290,2 (103,9 – 379,1)	7,0 (6,0 – 8,0)	5,0 (4,0 – 6,1)	8,3 (6,7 – 9,5)
H	209,1 ± 67,5	279,6 ± 112,9	7,4 ± 1,4	4,9 ± 0,7	8,6 ± 0,4
	185,3(136,3 – 321,3)	300,9 (161,3 – 444,0)	7,0 (6,0 – 9,0)	5,0 (3,8 – 5,8)	8,0 (7,2 – 8,5)
K	220,7 ± 53,7	254,1 ± 71,6	6,5 ± 0,92	4,9 ± 0,6	8,0 ± 0,1
	195,3(168,8 – 302,2)	254,9 (159,3 – 344,3)	6,0 (6,0 – 8,0)	5,0 (3,7 – 5,5)	8,0 (8,0 – 8,2)
KW	3,19	0,40	3,55	2,14	0,43
P	0,36	0,94	0,32	0,54	0,93

Bu dönem Western Blot incelemelerde de Kirenol 4mg/kg grubunda WNT3a, β- Catenin, Runx-2, LRP-5 deki artış kontrol grubuna göre daha az gerçeklemiş iken intranükleer proteinlerin artışı daha fazla olmuştur (Şekil 6).

Şekil 6. 21. Gün deneklerinde WNT 3a, β-Catenin, LRP 5, Runx2, TCF ve LEF western blot sonuçları ve Image j analizine ait grafikler. Sonuçlar 21. güne ait deneklerin kendi grupları içinde protein seviyelerinin değişimini göstermektedir.



42. gün gruplarında en yüksek histolojik skor BMP uygulanan grupta bulunmuşken (9,6) 4 mg/kg Kirenol uygulanan grupta ikinci yüksek histolojik skor (8,8) ve en yüksek röntgen skoru (9,3) bulunmuştur. BMP uygulanan gruptaki histolojik skor ile kontrol grubu ve 2 mg/kg Kirenol uygulanan grupların histolojik skorları arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) Alkalen fosfataz ve Kallus Hacmi değerlerinde gruplar arasında anlamlı fark görülmemiştir (Tablo 17). 42. gün preparatları santrifüj sırasında zayi olduğu için Western Blot Analizleri yapılamamıştır.

Tablo 17. Kırk ikinci günde sakrifiye edilen deneklerin Kallus Hacmi, Dansite, Histolojik skor, Alkalen Fosfataz ve Röntgen skorlarının karşılaştırılması. Nicel veriler "Aritmetik Ortalama ± SD ve Ortanca (Min – Max)" olarak gösterilmiştir.

	Kallus Hacmi	**Dansite**	**Histoloji**	**ALP**	**Röntgen**
L	239,8 ± 56,5	318,0 ± 176,7	7,6 ± 7,9 [a]	6,1 ± 0,9	8,6 ± 1,5
	230,0 (160,6 – 347,3)	379,3 (66,9 – 504,8)	8,0 (6,0 – 8,0)	5,7 (5,3 – 7,7)	8,0 (7,5 – 11,5)
M	256,0 ± 198,8	291,0 ± 379,4	8,4 ± 1,1 [a]	5,9 ± 0,6	9,2 ± 1,4
	210,3 (47,7 – 668,7)	305,3(-360,7 – 808,6)	8,5(6,0 – 10,0)	6,1 (5,0 – 6,9)	9,3 (7,5 – 10,7)
N	437,0 ± 363,0	100,5 ± 99,7	8,8 ± 1,3 [b]	5,8 ± 1,2	9,3 ± 1,6
	318,1 (105,0 – 1010,0)	84,4 (-30 – 275,5)	9,0 (7,0 -10,0)	5,8 (4,2 – 7,4)	9,3 (7,2 – 11,7)
O	331,2 ± 192,8	114,7 ± 51,0	9,6 ± 0,5 [b]	6,1 ± 1,0	9,0 ± 2,1
	252,7 (105,0 – 624,7)	106,0 (42,9 – 215,3)	10,0 (9,0 – 10,0)	6,1 (4,7 – 7,6)	9,3(6,0 – 11,3)
KW	0,89	6,97	12,65	0,34	0,70
P	0,83	0,07	0,005	0,95	0,87

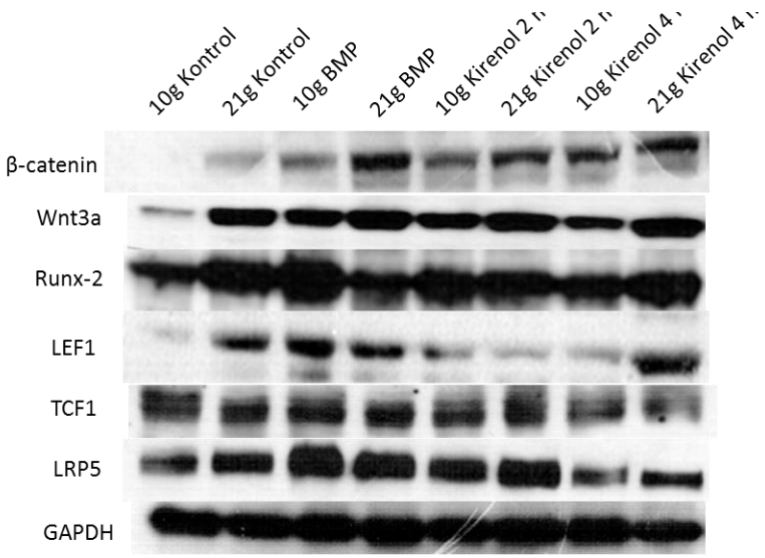
[a,b]: Her kolonda aynı harfi taşımayan gruplar arasındaki fark önemlidir ($p<0,05$).

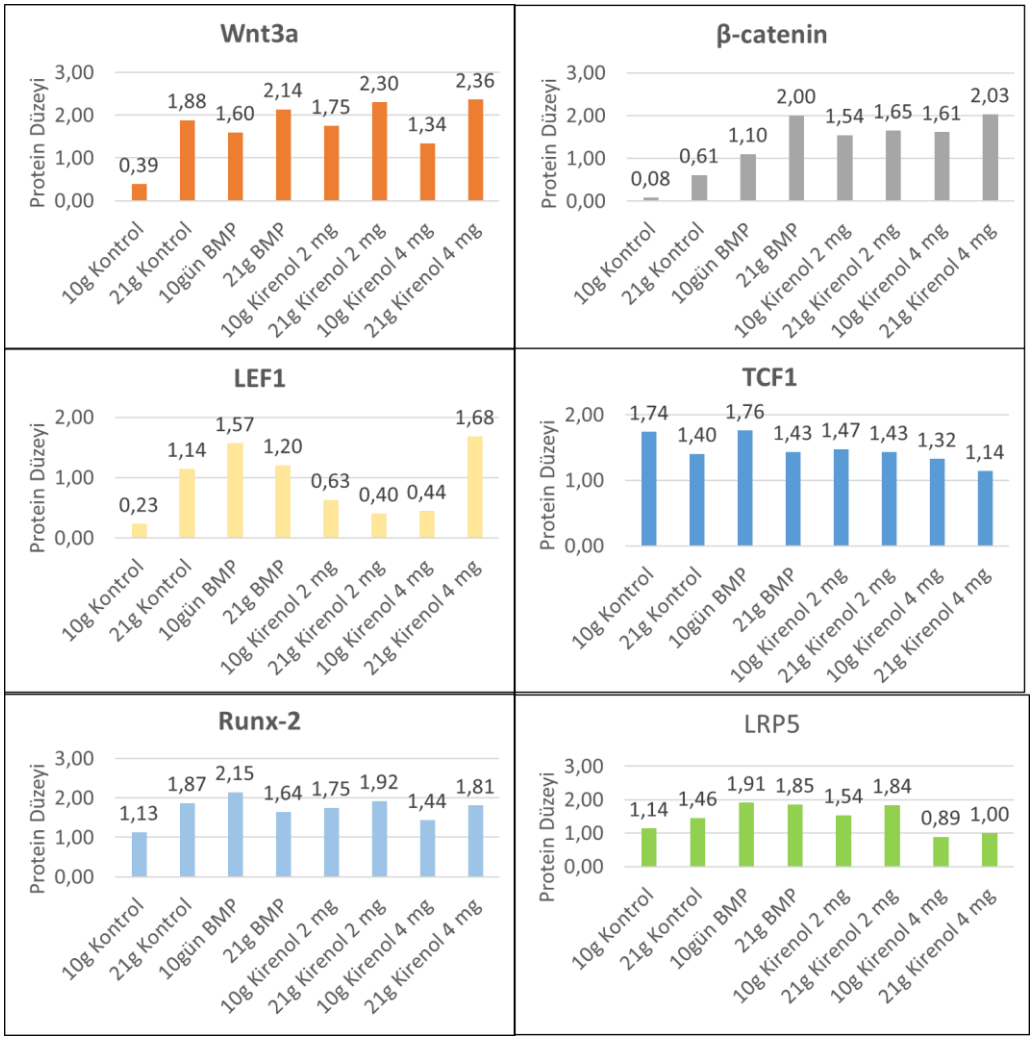
Western blot analizleri 10. gün ve 21. gün denekleri için aynı ve farklı jellerde olmak üzere Şekil 7 ve Şekil 8'de görüldüğü yapılmıştır.

Şekil 7'deki sonuçlar 10 ve 21. güne ait deneklerin grupları arasındaki protein seviyelerinin değişimini göstermektedir.

Şekil 8'de görüldüğü gibi Kirenol uygulanan gruplarda ekstranükleer proteinlerden WNT3a, β–Catenin, LRP 5, Runx2 erken dönemde hızla aktive olmaktadır. Ancak kaynama sürecinin tamamlanmaya yaklaşmasıyla kontrol grubu bu farkı kapatmaktadır.

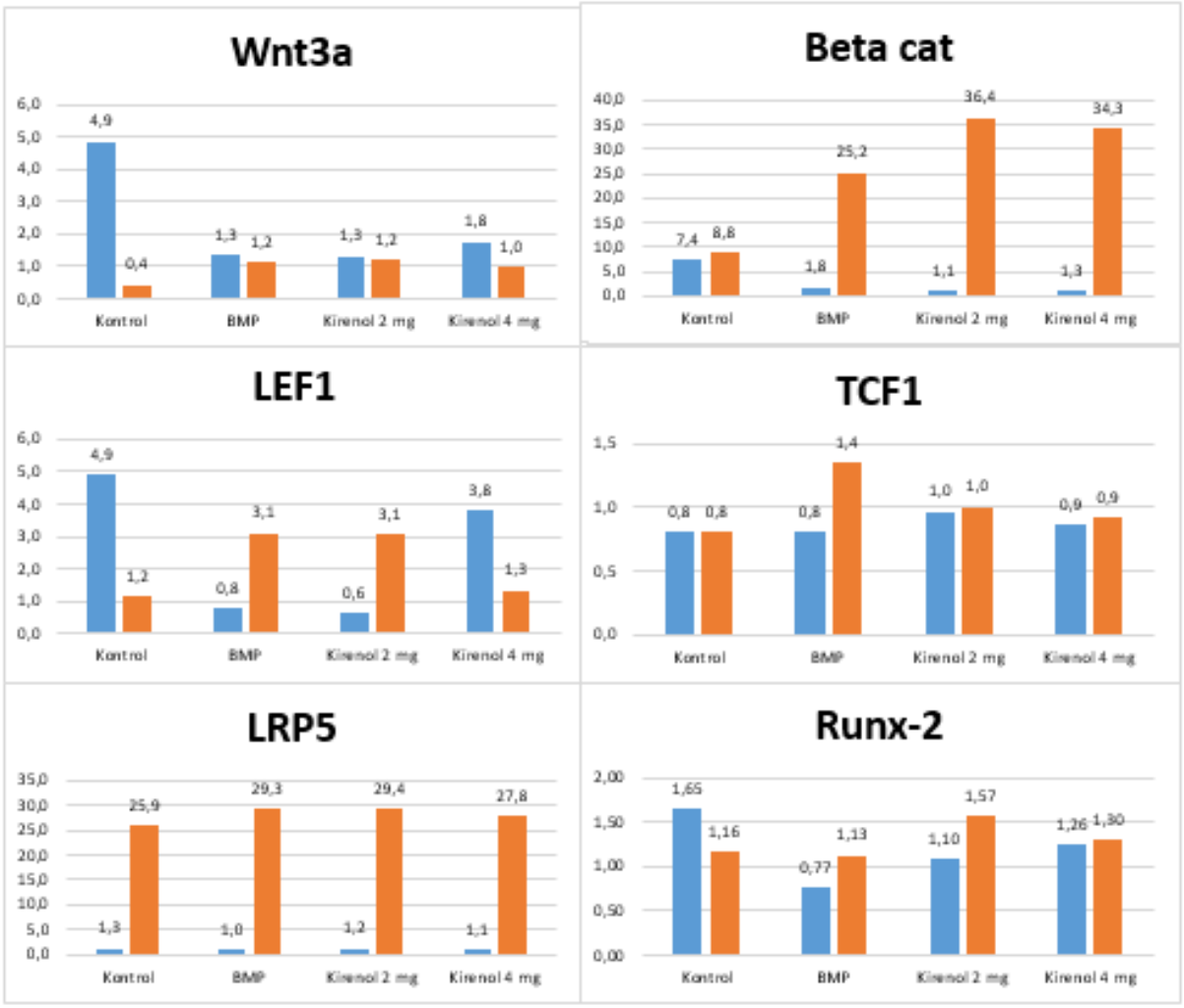
Şekil 7. 10. ve 21. gün deneklerinin aynı jeldeki WNT 3a, β – Catenin, LRP 5, Runx2, TCF ve LEF western blot sonuçları ve Image j analizine ait grafikler





Şekil 8. Şekil 7'deki sonuçlara göre elde edilen WNT3a, β – Catenin, LRP 5, Runx2, TCF ve LEF western blot düzeylerinin günlere göre değişimi

10 ile 0. gün arasındaki oran
21 ile 10. gün arasındaki oran



TARTIŞMA

Kirenol veya BMP uygulanan denek gruplarının tümünde aynı günde sakrifiye edilmiş Kontrol grubundan daha yüksek Röntgen ve Histopatolojik skor ortalamaları elde edilmiştir. Bu fark 10. günde anlamlı bulunmuşken; 21.günde gruplar arasındaki fark anlamlı kabul edilmemiş, 42.günde ise sadece histopatolojik skorlardaki yükseliş anlamlı bulunmuştur. Bu durum Kirenol'ün ve BMP'nin kırık iyileşmesi işinin daha hızla yapılmasını sağlamasına, ilk 10 günde bu sürecin hızla işlemesine ancak sürecin sonuna yaklaştıkça kırık kaynamasının aktivasyonunun azalmasına ve kontrol grubunda iyileşmenin gecikmeyle de olsa diğer grupları yakalaması olarak yorumlanmıştır. Colburn ve ark. tarafından yapılan çalışmada da kırık sonrası BMP uygulamasının erken dönemde kırık iyileşmesini aktive ettiği ancak bu aktivasyonun ilerleyen günlerde azaldığı gösterilmiştir(15).

Alkalen fosfataz (ALP) özellikle karaciğer ve kemikten salgılanan osteoblastik aktivitenin izlenmesinde kullanılan bir belirteçtir. Bu çalışmada farklı günler ve farklı uygulamalar dikkate

alındığında gruplar arasında ALP değerleri arasında anlamlı fark görülmemiştir. Kim MB ve ark. tarafından yayınlanan bir hücre kültürü çalışmasında Kirenol'ün doz bağımlı olarak Alkalen fosfataz düzeylerini kontrol grubuna 3. günde artırdığı gösterilmiştir (6). Bu farklılık kırık oluşturma zamanı ile ALP örneğinin alındığı zaman farkından kaynaklı olabilir. Sonraki çalışmalarda ALP örneklerinin ilk üç günde alınması yararlı olabilir ancak ratlardan kan alınmasının zorluğu ve kan alınması sonrası ratların ölme riskinin olması veya iyileşmenin bu travma nedeniyle standartının bozulması bunu engelleyen sebeplerden olduğunu düşünmekteyiz.

Kallus kırık iyileşmesinin varlığını gösteren parametre olarak kullanılmaktadır (13). Bu çalışmada denekler arasında kallus hacimleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Bunun sebebi grup içi kallus ortalamaları alındığında standart sapmalarının çok büyük olmasına bağlanmıştır. Çünkü kırıkların tespitinde rijit bir fiksasyon yöntemi kullanılmamıştır. Sekonder iyileşen bu kırıklarda redüksiyonun anatomik, fiksasyonun daha stabil olması daha iyi bir kaynamayı sağlarken kallus hacmini azaltmaktadır; aynı zamanda redüksiyonu kötü olup kaynamayan kemiklerde de kallus hacmi azalmaktadır (16). Buna ters olarak malredüksiyonda kaynamış bir kemikte oldukça yüksek kallus hacimleri görülebilmektedir. Yani kallus hacmi kırık iyileşmesinin daha iyi ya da daha kötü olduğunu direkt olarak gösterebilecek bir parametre değildir. Yapılan çalışmalarda kallus hacim ölçümleri radyografi kullanılarak(17,18) ölçülse de BT'de ölçülen kallus dansitesi daha tutarlı bir veri olarak görülmektedir. Bu çalışmada ratların değerlendirmesinde kullanılan histolojik ve radyolojik skorlama sonuçları ile BT dansite skorları arasında anlamlı bir korelasyon bulunmuştur. 10. gün gruplarında Kirenol 4mg/kg ve BMP2 uygulanan gruplarda kallus dansitesi anlamlı olarak artmıştır. Bu durum Kirenol'ün kemik mineralizasyonunu erken dönemde artırması ile uyumlu olarak yorumlanmıştır. Bu sayede Kirenol verilen olgularda kallusun daha erken güçlenmesi sağlanabilecek ve kırık sonrası yük verme, işe dönüş süresini kısaltabilecek; implant yetmezliği riski azaltılabilecektir.

WNT sinyal yolağının kemik iyileşmesi ve mineral yoğunluğunun artırılmasında aktif olarak rol oynadığı düşünülmektedir. Yolağın aktivasyonu ile kemiğin sağlamlığının ve mineral yoğunluğunun arttığı; inhibisyon ile kemik kırılganlığının arttığı bilinmektedir (19). Bu sebeple kemik iyileşmesi için bu yolağı aktive edebilecek moleküller üzerindeki çalışmalar hız kazanmıştır. WNT yolağının kırık durumunda aktive olduğu kontrol grubu ve sağlam deneklerin western blot analizleriyle çalışmamızda doğrulanmıştır. Kontrol grubundaki deneklerin kemiklerinin kırılması sağlam deneklere göre yolağın ekstrasellüler aktivatörü WNT3a' nın ve intrasellüler elemanı β-catenin seviyelerinde az da olsa akut bir artışa sebep olmuştur. Ayrıca bütün gruplarda WNT seviyesi, sağlam femur grubundan belirgin şekilde yüksek ölçülmüştür. Bu sonuç, WNT sinyal yolağının aktivasyonunun, kırığa bağlı olarak

kemikte oluşan hasara karşı geliştiğini ve WNT sinyal yolağının kemiğin tamir edilmesinde katkısı olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamız sonuçlarına dayanarak BMP-2 ve Kirenolün WNT sinyal yolağını aktive ettiği western blot analizlerinde ortaya konmuştur. Bu aktivasyon BMP-2 ve kirenolün LRP5 reseptörüne bağlanması, hücre içi aktif GSK3β protein düzeylerinin azalması veya bu enzimin aktivitesini doğrudan inhibe etmesiyle meydana gelmiş olabilir.

WNT sinyal yolağındaki LRP5 ve Frizzled reseptörlerine bağlanan moleküller lipitte çözünebilirlikleri ve birbirlerinden farklı kimyasal yapıya sahip olmalarıyla karakterize edilmişlerdir (20). Buna dayanarak moleküler yapısından bağımsız olarak Kirenolün lipofilik özelliğe sahip olmasından dolayı hücre membranında çözünerek WNT reseptörlerine bağlanmış olabilir. Buna ek olarak Kirenol, BMP-2' ile benzer şekilde kemik homojenatında ölçülen LRP5 reseptörü düzeylerini artırmıştır ve bu artışı da osteblast hücre yüzeyinde yer alan LRP5 üzerinden gerçekleştirmiş olabilir. Zhang ve ark. osteoblast hücrelerinde gerçekleştirmiş olduğu çalışmaya göre BMP-2, LRP5 mRNA seviyelerini artırmış ve bu artış araştırmacılar tarafından BMP-2' nin fosforile olmayan aktif haldeki β-catenin seviyelerini artırmasına bağlanmıştır (21). Bu sonuç göz önünde bulundurulduğunda, bizim çalışmamızda da kirenol total β-catenin seviyelerini yükseltmiş ve buna bağlı olarak LRP5 mRNA ekspresyonunu artırmış olabilir. Çalışmamız BMP-2 açısından Zhang ve ark. invitro ortamda yürütmüş oldukları deney sonuçlarını doğrular nitelikte olup, Kirenol'ün de BMP-2' ye paralel etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Buna ek olarak, Kirenol'ün Frizzled reseptörü seviyesini nasıl etkilediği ve bu reseptöre bağlanmasıyla ilgili olarak araştırmalar yapılabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır.

β – Catenin seviyesinin artışının ise doğrudan GSK3β enzim inhibisyonuna bağlı olarak gerçekleşip gerçekleşmediği, invitro GSK3β enzim inhibisyonu deneyleriyle araştırılabilir ve böylece Kirenol ile BMP-2' nin Wnt yolağı aktivasyonu yapmaları sonucunda β-catenin seviyelerini yükseltmeleri etkisine GSK3β aktivitesinin katkısı aydınlatılabilir.

WNT sinyal yolağı üzerindeki etkilere ek olarak Kirenol, BMP-2' ye paralel bir şekilde Runx2 düzeyini artırmıştır ve bu etki aracılığıyla kemik osteoblast hücrelerinin farklılaşmasını-proliferasyonunu artırarak kemik iyileşmesine katkı sağlamış olabilir. Buna ek olarak β-catenin seviyesindeki artışın ve WNT yolağının aktive olması, Runx2 düzeylerinin yükselmesine de katkı sağlamış olabilir. Runx2 ve β-cateninin osteblast sayısını, aktivitesini ve kollajen sentezini artırdığı daha önceden yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (22). Kemik yapımına osteoblastlar üzerinden olan bu pozitif etki, osteoporoz gibi kemik mineral yoğunluğunun ve osteoklastik aktivitenin arttığı rahatsızlıklar için de WNT sinyal yolağı ile Runx2' nin potansiyel terapötik hedefler olabileceğini düşündürmektedir; çünkü Kato ve ark. LRP5 geni taşımayan-WNT sinyal yolağı inaktif farelerde osteopeni olduğunu gözlemiş ve

LRP5 inaktivasyonunun hem kemik hem de gözü etkileyen Osteoporoz - Psödoglioma Sendromundan sorumlu olabileceği sonucunu çıkarmışlardır (23). Çalışmamızda Kirenol LRP5 seviyelerini kontrol grubuna göre yükseltmiş ve buna ek olarak WNT yolağının aktivasyonunu LRP5 dışında, Wnt3a, β-catenin seviyelerini artırarak sağlamıştır. Dolayısıyla Kirenol, kemik kaybıyla karakterize osteopeni ve osteoporoz gibi rahatsızlıklarda mineral yoğunluğunu artırma açısından hem Runx2 hem de WNT sinyal yolağı üzerindeki etkisinden dolayı da faydalı olabilir (24).

SONUÇ

Sonuç olarak; bu çalışma Kirenol'ün WNT/ β-Catenin yolağını erken dönemde aktive ederek kırık iyileşmesini hızlandırdığının gösterildiği ilk in-vivo çalışmadır. Kirenol ve BMP-2' nin kemik iyileşmesini artırması altında yatan moleküler etki mekanizmasının hem Runx-2 hem de WNT sinyal yolağı aktivasyonu olduğu söylenebilir.

Bu araştırma ileride Kirenol'ün osteoklastik-osteoblastik aktivite ve kemik homeostazından sorumlu olduğu bilinen hedgehog, transforming growth factor-beta, notch gibi sinyal yolaklarıyla olan ilişkisi, moleküler etki mekanizmasının tam olarak aydınlatılabilmesi açısından da araştırılmaya değerdir.

KISITLILIKLAR

Çalışma bir deney hayvanı çalışmasıdır. Daha değerli bilgiler için daha fazla sayıda ve haversian sistemin incelenebileceği bir denek grubunda çalışılması uygun olacaktır.

ÇIKAR İLİŞKİSİ

Yazarlar herhangi bir çıkar ilişkisi/çatışması bildirmemiştir.

KAYNAKLAR

1. Bi, J., Xin, H.L., Lin, Z.F., Lin, W.H., Qian, R.Q. 2007. "Effect of kirenol on cytokines in serum and apoptosis proteins expression in synoviocytes of adjuvant arthritis rats", Chinese Traditional and Herbal Drugs, 38, 1207–10.

2. Qian, R.Q., Zhang, C.Y., Fu, H.Z. 2000. "Study on therapeutic mechanism of anti-rheumatism action of Herba siegesbeckiae", Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 20, 192–5.

3. Wang, J.P., Zhou, Y.M., Ye, Y.J., Shang, X.M., Cai, Y.L., Xiong, C.M., Wu, Y.X., Xu, H.X. 2011. "Topical anti-inflammatory and analgesic activity of kirenol isolated from Siegesbeckia orientalis", Journal of Ethnopharmacology, 137, 1089-94.

4. Xin, H.L., Bi, J., Liu, M., Lin, W.H., Qian, R.Q. 2005. "Experimental study on antiinflammatory and immune-regulating effect of kirenol", Chinese Traditional and Herbal Drugs, 36, 866-9.

5. Kim, MB., Song, Y., Kim, C., Hwang, J.K. 2014. "Kirenol inhibits adipogenesis through activation of theWnt/β-catenin signaling pathway in 3 T3-L1 adipocytes", Biochemical and Biophysical Research Communications, 445:433–8.

6. Kim, M.B., Song, Y., Hwang, J.K. 2014. "Kirenol stimulates osteoblast differentiation through activation of the BMP and Wnt/β-catenin signaling pathways in MC3T3-E1 cells", Fitoterapia, 98, 59–65.

7. Wood, G.W. 2003. Page 2688. Campbell's Operative Orthopaedics. Edited By: Canale, S.T. Philadelphia: Mosby.

8. Glass G.E., Jain A. 2013. “Cochrane corner: bone morphogenetic protein (BMP) for fracture healing in adults”, J Hand Surg Eur Vol, 38, 447-49.

9. Zhang, R., Oyajobi, B.O., Harris, S.E., Chen, D., Tsao, C., Deng, H.W., Zhao, M. 2013. “Wnt/β-catenin signaling activates bone morphogenetic protein 2 expression in osteoblasts”, Bone, 52, 145-56.

10. Behrens, J., Von Kries, J.P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., Birchmeier, W. 1996. “Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1”, Nature, 382, 638-42.

11. Rawadi, G., Vayssiere, B., Dunn, F., Baron, R., Roman-Roman, S. 2003. “BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop”, Journal of Bone and Mineral Research, 18, 1842– 53.

12. Diwan, A., Leong, A., Appleyard, R., Bhargav, D., Fang, Z., Wei. A. 2013. “Bone morphogenetic protein-7 accelerates fracture healing in osteoporotic rats” Indian Journal of Orthopaedics47,6. 540 – 46 **52**

13. Augat P., Morgan E.F., Lujan T.J., MacGillivray T.J., Cheung W.H. 2014. “Imaging techniques for the assessment of fracture repair”, Injury, 45, 16-22. **53**

14. Huo M.H., Troiano N.W., Pelker R.R., Gundberg C.M., Friedlaender G.E. 1991. “The influence of ibuprofen on fracture repair: biomechanical, biochemical, histologic, and histomorphometric parameters in rats”, J Orthop Res, 9, 383-90. **54**

15. Colburn, N.,Kristien,J., Zaal, N., Wang, F., Tuan, R. 2009 “A Role for /T Cells in a Mouse Model of Fracture Healing.” Arthrıtıs & Rheumatısm 60, 6, 1694–1703

16. Henderson CE, Lujan TJ, Kuhl LL, Bottlang M, Fitzpatrick DC, Marsh JL. 2010 “Mid-America Orthopaedic Association Physician in Training Award: healing complications are common after locked plating for distal femur fractures.” Clin Orthop Relat Res 2011;469(6):1757–65.

17. Welch,R., Jones, A., Bucholz, R. Reınert, C., Tjıa, J, Wıllıam Pıerce,W. Wozney, J,3 And Lı, X.1998. “Effect of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 on Fracture Healing in a Goat Tibial Fracture Model” Journal of NObe and Mineral Research.13,9,1483-90

18. Rajfer, R. A., Kilic, A., Neviaser, R. A., Schulte,L. M., Hlaing, S. M., J. Landeros,J., M. G. Ferrini,M.G., E. Ebramzadeh,E., Park,S.H. 2017. “Acceleration of Fracture Healing Via Inducible Nitric Oxide Synthase.”Bone and Joint Research.6,2 90-97

19. Baron, R., Kineissel M., 2013.”WNT Signaling İn Bone Homeostasis And Disease: From Human Mutations To Treatments”Nature Medicine.19,179-92

20. R&D System. Wnt Receptors & Pathways. https://www.rndsystems.com/resources/articles/wnt-receptors-pathways

21. Zhang, M, Yan, Y., Lim, Y., Tang D.,Xie,R., Chen, A., Tai, P., Harris, S.,Xing,L., Qin,Y., Chen,.Di.2010 “BMP-2 Modulates β-Catenin Signaling Through Stimulation of Lrp5 Expression and Inhibition of β-TrCP Expression in Osteoblasts.” Journal of Cel Biochemistry.108.896 – 905

22. Karner C.,Long F.,2016. Wnt signaling and cellular metabolism in osteoblasts.Cellular and Molecular Life Sciences. DOI 10.1007/s00018-016-2425-5

23. Kato,M., Patel, M.S., Levasseur, R., Lobov, I., Chang ,B.H., Glass, D.A., Hartmann, C., Li, L., Hwang, T.H., Brayton, C.F., Lang, R.A., Karsenty, G., Chan, L. J.2002 “Cbfa1-İndependent Decrease İn Osteoblast Proliferation, Osteopenia, And Persistent Embryonic Eye Vascularization İn Mice Deficient İn Lrp5, A Wnt Coreceptor.” Cell Biol. 15;157(2):303-14.

24. Hojo,H.,Ohba,S.,Chung, U., 2015 .”Signaling Pathways Regulating The Specification And Differentiation Of The Osteoblast Lineage.”Regenerative Therapy.1, 57-62

PROJE SONUÇ RAPORU YAZIMINDA UYULMASI GEREKEN KURALLAR

Ulusal ve Uluslararası Araştırma İşbirliği Destek Projesi, Dış Destekli Projeler İçin İhtiyaç Projesi ve Güdümlü Projeler İçin Sonuç Raporu Yazımında Dikkat Edilecek Hususlar

- Kapak sayfasından sonra alınan desteğin ne şekilde kullanıldığını ve hangi sonuçlara ulaşıldığını açıklayan en az bir sayfalık bilimsel içerikli rapor hazırlanarak pdf formatında elektronik ortamda birime sunulmalıdır.
- Sonuç raporu sisteme yüklenirken Türkçe ve İngilizce kısa özet girilmesi de zorunludur.

Tez Projeleri Sonuç Raporu Yazımında Dikkat Edilecek Hususlar

- Araştırmacılar ilgili enstitü veya uzmanlık eğitiminin yapıldığı fakültenin belirlediği kurallara göre yazılmış tezlerini pdf formatında elektronik ortamda birime sunmalıdır.
- Hazırlanan tezlerde çalışmanın ERÜ BAP Koordinasyon Birimi tarafından desteklendiğine dair bir ibareye yer verilmesi zorunludur.
- Proje çalışmasından elde edilen veriler veya sonuçlar kullanılarak üretilmiş yayınlar var ise, rapor sonunda listelenmeli ve yayının bir örneği sisteme eklenmelidir.
- Sonuç raporu sisteme yüklenirken Türkçe ve İngilizce kısa özet girilmesi de zorunludur.