



T.C.

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

**LOKAL ATORVASTATİN UYGULAMASININ
KEMİĞİN UZUNLAMASINA BÜYÜMESİNE ETKİSİ**

**Dr. Aziz VURUCU
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç.Dr. Metin M. ESKANDARI**

Bu tez, BAP-TF-CTB (AV) 2007-1 TU kodlu proje olarak
Mersin üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
desteklenmiştir

MERSİN-2007

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
İNGİLİZCE ÖZET	6
GİRİŞ ve AMAÇ	7
GENEL BİLGİLER	9
İskelet Sistemi Gelişimi ve Oluşumu	9
Kemikleşme	10
İntramembranöz Kemikleşme	10
Endokondral Kemikleşme	11
İkincil Kemikleşme Merkezleri	13
Uzun Kemiklerde Uzunlamasına Büyüme.....	13
Büyüme Plağı	13
Büyüme Plağı Morfolojisi	14
Matriks Sentezi ve Hücre Proliferasyonu Düzenlenmesi	15
Kondrosit Maturasyon ve Hipertrofisi.....	16
Matriks Mineralizasyonu	17
Kondrosit Apoptozu	18
Damarlanma.....	18
Fizis Kapanması	18
Kemik Büyümesine Etkili Faktörler	19
Statinler.....	21
GEREÇ ve YÖNTEMLER	28
Makroskobik Ölçüm	30
Biyokimyasal İşlemler	34
Histolojik İşlemler	34
İstatiksel Analizler	35
BULGULAR	36
Makroskobik Bulgular	36
Biyokimyasal Bulgular	37
Histolojik bulgular.....	38
TARTIŞMA	45

SONUÇ ve ÖNERİLER.....	51
KAYNAKLAR	52
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	61
ŞEKİLLER ve RESİMLER DİZİNİ.....	63
TABLolar DİZİNİ	64

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim süresince emeği geçen ve katkılarını esirgemeyen Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Fehmi KUYURTAR'a, tez konunun belirlenmesinde katkısı olan tez danışmanım Doç. Dr. Metin M.Eskandari'ye, Doç. Dr. Volkan Öztuna'ya, Doç. Dr. Abtullah Milcan'a, Yrd. Doç. Dr. İrfan Ayan'a, Yrd. Doç. Dr. Mehmet Çolak'a, tezimin biyokimyasal bölümüne olan katkısından dolayı Doç. Dr. Gülçin Eskandari'ye, tezimin histoloji kısmına katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Ebru Ballı'ya, istatistiksel analiz kısmında katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Bahar Taşdelen'e ve manevi katkılarından dolayı başta Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı asistanlarına ve diğer çalışma arkadaşlarıma içtenlikle teşekkür ederim.

Dr.Aziz VURUCU

Mersin-2007



**T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

**LOKAL ATORVASTATİN UYGULAMASININ KEMİĞİN
UZUNLAMASINA BÜYÜMESİNE ETKİSİ**

**Dr. Aziz VURUCU
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç.Dr. Metin M. ESKANDARI**

MERSİN-2007

ÖZET

Kemiğin uzunlamasına büyümesi fizis hattında endokondral kemikleşme ile gerçekleşir. Bu süreç bir çok sistemik ve lokal faktörden etkilenmektedir. Rutinde kolesterol düşürücü olarak kullanılan statinlerin sistemik verildiğinde kemik oluşumunu stimüle ettiği bildirilmiştir. Benzeri literatürde bulunmayan bu çalışmada deneysel modelde lokal olarak intraosseöz uygulanan atorvastatinin kemiğin uzunlamasına büyümesi üzerindeki etkisini araştırılmaktadır.

Çalışmanın materyali 45 adet 30 günlük erkek Wistar albino cinsi sıçandı. Denekler sham (n=13), kontrol (n=12), 5mg atorvastatin verilen (n=10) ve 10 mg atorvastatin verilen (n=10) gruplarına ayrıldı. Çalışma gruplarında sıçanların sağ femur distal metafizlerine intraosseöz atorvastatin çözelti enjeksiyonu yapıldı. Kontrol grubunda eşit hacimde serum fizyolojik enjekte edildi. Çalışmanın 12, 24 ve 36. günlerde her gruptan rastgele seçilen sıçanlar yüksek doz anestezi altında kardiyak kan aspirasyonu yapılarak kurban edildi. Biyokimyasal olarak atorvastatinin sistemik etkinliğinin göstergeleri (serum kolesterol, trigliserit, yüksek dansiteli lipoprotein) ve osteoblastik aktivite göstergeleri (serum alkalen fosfataz ve osteokalsin) çalışıldı. Morfometrik olarak sıçanların her iki femur ve tibiaları disseke edilerek çıkarıldı ve boyları ölçüldü. Mikroskopik çalışma için femurların distal ve tibiaların proksimal büyüme plaklarından kesitler hazırlanarak, büyüme plağı kalınlığının mikrometrik ölçümü ve her iki büyüme plağının proliferatif bölge kondrosit sayımı yapıldı. Serum biyokimyasal parametreleri yönünden gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Ölçülen femur ve tibiaların makroskopik uzunlukları, büyüme plağı kalınlığı ve proliferatif bölge kondrosit sayısı açısından gruplar arasında ve her grubun sağ ve sol tarafları arasında fark saptanmadı.

Sonuç olarak lokal yapılan tek intraosseöz atorvastatin uygulamasının kemiğin uzunlamasına büyümesi üzerinde etkisi bulunduğuna dair bir kanıtı varılmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Atorvastatin, kemiğin uzunlamasına büyümesi, lokal ilaç etkisi.

The Effect of Local Application of Atorvastatin on Longitudinal Bone Growth

Longitudinal bone growth occurs on the physis layer through endochondral ossification. Endochondral ossification is affected by a wide range of systemic and local factors. To our knowledge, there is no study in the literature about the effect of locally applied statins on bone formation. In this study we aimed to investigate the local effects of intraosseous injected atorvastatin on longitudinal bone growth.

The material of this study was 45 Wistar albino male rats with 30 days of age. Animals were divided into four groups, sham (n=13), control (n= 12), five milligram atorvastatin applied (n=10) and 10 mg atorvastatin applied (n= 10) groups. Atorvastatin was injected intraosseously to the right distal femoral metaphysis of the rats in the study groups. In control group, same volume of saline was injected. At 12th, 24th and 36th of study randomly selected rats of each group were sacrificed by cardiac blood aspiration under deep anesthesia. Biochemically, serum cholesterol, triglyceride and high-density lipoprotein were studied to demonstrate systemic anti-lipidemic effectivity of atorvastatin. Alkaline phosphatase and osteocalcin were studied to demonstrate the changes in osteoblastic activity. The lengths of both femora and tibiae of the euthenized rats were measured macroscopically after dissection of the bones from soft tissue. Histologically, the thickness of the growth plates of the distal femora and proximal tibiae were measured micrometrically. Proliferative zone of these growth plates were assessed microscopically to count the number of chondrocytes as a indicator of growth stimulation.

Biochemical parameters showed no statistical significance among groups. Also, there were no statistical significant results regarding the macroscopic lengths of femora and tibiae, thickness of the growth plates and chondrocyte number of the proliferative zones among the groups or between the right and left extremities of the experiments.

Consequently, this study showed no evidence that single intraosseous application of atorvastatin could effect on longitudinal growth of bones in a rat model.

Key Words: Atorvastatin, local drug application, longitudinal bone growth

GİRİŞ ve AMAÇ

Uzun kemiklerde konjenital, travmatik veya postoperatif olarak ortaya çıkan kısalık ya da deformite ortopedi disiplininin temel uğraş alanlarından. Bu deformiteler en çok çocukluk çağında kemiklerin uzunlamasına büyüme sürecini etkileyerek belirginleşirler. Fonksiyonel ve sosyal yönden önemli sorunlar oluşturan bu deformiteler, günümüzde düzeltici ve uzatma osteotomileri gibi invazif, ağırlı ve mekanik temelli ameliyatlara tedavi edilirler. Olgunluğa ulaşmamış kemiğin büyüme potansiyelini lokal ve selektif etkenlerle etkilemek ve deformitelerin önlenmesi veya düzeltilmesi için daha az invazif çözümler bulmak için halen deneysel bazdaki çalışmalar devam etmektedir. Burada sunulan çalışma da bu çabaların çerçevesi içerisinde yer almaktadır. Literatür bilgisi temelinde kemiğin selektif büyümesine etki yapabilecek ancak daha önce denenmemiş olan atorvastatinin kemik dokusundaki lokal etkinliği bu çalışmanın ana sorusunu oluşturmaktadır.

Kemiklerin uzunlamasına büyümesi birçok faktörün etkilediği son derece karmaşık bir süreçtir. Kemik yapının oluşumu, büyümesi ve kırık iyileşmesinin temelinde iki ana kemikleşme süreci yer almaktadır. Bunlardan birincisi osteoprogenitör hücrelerin direkt olarak osteoblastlara dönüşmesiyle gerçekleşen intramembranöz kemikleşmedir. Endokondral kemikleşmede kemik olacak bölgede önce bir hyalin kıkırdak model oluşup daha sonra kemik yapıya dönüşür. Kemiklerin uzunlamasına büyümesi, epifizlerdeki endokondral kemikleşme ile olur^{1,9,14,24}. Uzunlamasına büyüme sürecinin endojen ya da ekzojen, lokal ya da sistemik ve kimyasal ya da fiziksel olmak üzere bir çok etkene yanıt verdiği dair çalışmalar ve kanıtlar bulunmaktadır. Üzerinde en çok durulan etkenler, embriyonel dönemde şifrelenen transkripsiyon faktörleri, çocukluk çağında meydana gelen kırıklar, anabolik hormonlar ve büyüme faktörleridir^{14,60}. Kıkırdak ve kemik doku matriksinde bulunan kemik büyüme faktörleri otokrin ve parakrin etkilidir. Kemik morfogenik protein (Bone Morphogenetic Protein; BMP), değiştirici büyüme faktörü-beta (Transforming Growth Factor- β ; TGF- β), insülin benzeri büyüme faktörü (Insülin-Like Growth Factor; IGF), damar endotel kökenli büyüme faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF), trombosit kökenli büyüme faktörü (Platelet-Derived Growth Factor; PDGF) bu faktörlerden bazılarıdır^{1,24,63}. Kemik büyümesi üzerinde etkili sistemik hormonlar arasında büyüme, tiroit ve paratiroit

hormonları ile östrojen ve D vitaminini saymak olasıdır⁶². Büyüme faktörleri hücrel aktivitenin bölgesel düzenleyicisi olarak işlev görürler. Bu etki kondrosit, osteoblast ve osteoklastların çoğalmaları ve olgunlaşmaları ile makromolekül sentezi, kalsiyum dengesi ve matriks mineralizasyonu gibi biyosentetik aktivitelerini kapsar^{1,14,24}.

Statinler temelde spesifik Hidroksimetil Glutaril KoenzimA Redüktaz (HMG-CoA) enzim inhibitörleri olduklarından kolesterol düşürücü olarak rutin kullanımdadırlar^{81,85}. Statinler kolesterol sentez yolunda izoproneidlerin oluşumunu engelleyerek bir çok ek etkiye yol açarlar. Kemik metabolizmasını indüklemek, immun sistemi suprese etmek, vasodilatasyon, ateroskleroza ve trombüs oluşumunu azaltmak bu etkilerden bazılarıdır⁸².

Statinler, osteoblastlar üzerinden kemik oluşumuna anabolik etki yaparlar⁸¹. Bu etki ilk olarak Mundy ve ark.⁸⁸ tarafından tanımlanmıştır. İn vitro yapılan çalışmalarla özellikle lipofilik statinlerin (atorvastatin, simvastatin ve cerivastatin) osteoblastik hücre gruplarında kemik morfogenez protein-2 (BMP-2) ile VEGF oluşumunu indüklediği ve osteoklastların sayılarını azaltıp apoptozlarını indüklediği gösterilmiştir^{81,82,90}.

Literatürde benzerine rastlamadığımız bu çalışmanın amacı statin ailesinden atorvastatin'in büyüyen kemikteki lokal selektif etkisini araştırmaktır. Bunun için büyüme çağındaki sıçanlarda femur distal metafiz bölgesine iki ayrı doz ve eşit hacimde atorvastatin'in intraosseöz enjeksiyonunu planladık. Atorvastatin uyguladığımız çalışma gruplarını sham ve kontrol grupları ile kemiklerdeki makroskopik ve mikroskopik değişiklikler ve serumdaki lipid ve osteoblastik aktivite göstergeleri açısından kıyaslayarak sonuca gitmeyi uygun bulduk.

GENEL BİLGİLER

İskelet Sisteminin Oluşumu ve Gelişimi

Kemik oluşumu ve iskelet büyümesi moleküler, biyokimyasal ve hücresele olayları içeren karmaşık bir süreçtir ve embriyonik evrede programlanarak başlanır¹. Temel olarak iskelet sistemi nöral krest ile paraaksiyal ve lateral mezodermden gelişir^{2,3}. Notokord ve nöral tüp gelişirken, intraembriyonik mezoderm longitudinal iki paraksiyal mezodermi meydana getirir. Embriyonik gelişmenin 4. haftasında ventrolateral vücut duvarında kabartılar şeklinde ekstremitte tomurcukları belirir. Bu ekstremitte tomurcukları ektoderm tabakası ile çevrili mezenşim kitlesi içerir. Ektoderm tabakası daha sonra kalınlaşarak apikal ektodermal kabartıyı (AER) oluşturur. Apikal ektodermal kabartı ekstremitelerin gelişmesini ve büyümesini başlatan ekstremitte mezenşiminde indüksiyon etkisi yapar. Apikal ektodermal kabartıya komşu olan mezenşim hızlı çoğalan fakat henüz farklılaşmamış hücre grupları halini alır. Daha uzaktaki mezenşim kıkırdak kemik modellere ve kan damarlarına farklılaşmaya başlar^{3,4,5}.

Ekstremitte tomurcuklarının oluşumu ve apikal ektodermal kabartının fonksiyonu moleküler düzeyde araştırılmıştır. Cıvciv embriyolarında yapılan çalışmada ektopik ekstremitte tomurcukları oluşumunu Fibroblast Büyüme Faktörleri (FGF-1, FGF-2 ve FGF-4) ile BMP'nin tetiklediği gösterilmiştir¹. İskelet morfogenezinde rol alan genler Homeobox (HOX) ve Paired box (PAX) genleri olup ilk olarak Drosophila'larda tanımlanmışlardır¹. Homeobox genleri, segmentasyon ve vücut eksen oluşumunu düzenlerler ve insanda HOXA, HOXB, HOXC, ve HOXD olmak üzere dört kopya halinde bulunurlar. Bu genler her üç germ tabakasının kraniyokaudal yönde biçimlenmesini sağlarlar^{1,2,6}. Paired box genleri nöral tüp ve sklerotomda sentezlenirler ve somitler ile santral sinir sistemine ait farklı bölgelerin özelleşmesinde rol oynarlar^{6,7}.

İskelet gelişiminde sırasıyla epitelyal etkileşimler, mezenşimal hücre yoğunlaşması ve hücre farklılaşması aşamaları gerçekleşir⁸. Bu aşamaların en önemlisi 4. haftada meydana gelen mezenşimal hücrelerin yoğunlaşmasıdır^{2,3,8}. İskeletin oluşmaya başlaması hem kondrojenik hem de osteojenik yoğunlaşmaya bağlıdır. Kondrojenik yoğunlaşmanın ileride iskeleti oluşturacak olan kıkırdak taslağa geçiş, proksimalden distale ve anteriordan posteriora doğru gerçekleşir. Bu geçişi taslağın bifurkasyonu ve segmentasyonu takip eder³.

Kemikleşme

Kemikleşme; intramembranöz ve endokondral olmak üzere iki ana şekilde gerçekleşir. Her iki yolla oluşan kemik matriks temel olarak benzer özelliklere sahiptir. İlk olarak ortaya çıkan kemik dokusu, trabeküler yapıya sahip birincil veya olgunlaşmamış kemik dokusudur. Buna birincil trabeküler kemik adı verilir. Bu tip kemik dokusunda kollajen lifler düzensiz dizilmiş olduğundan lameller yapı belirgin değildir. Bu kemik dokusu geçicidir ve daha sonra yerini lamelli kemik dokusuna bırakır^{1,9,10}.

İntramembranöz Kemikleşme

Kemiklerin periostal yüzeylerindeki primitif mezenşimal hücrelerin doğrudan osteoblastlara dönüşmesiyle oluşan kemikleşmeye intramembranöz kemikleşme denir¹. Mezenşim hücreleri kemiğin oluşacağı bölgelerde bir araya gelerek hücre grupları oluştururlar. Bu hücre yoğunlaşmaları membrana benzediği için bu kemikleşme türüne intramembranöz adı verilmiştir^{9,10}. Kemikleşmenin olacağı bölgede ilk gerçekleşen olay mezenşim dokusunun kan damarları açısından zenginleşmesidir^{10,11}. Primitif mezenşimal hücreler oluşan bu kan damarları çevresinde yoğunlaşarak osteoprogenitör hücrelere dönüşür. Daha sonra osteoprogenitör hücrelerin sitoplazmaları yapısal değişiklikler uğrayarak bazofilik görünüm kazanırlar ve böylece osteoblastlara farklılaşmış olurlar. Osteoblastlar kemik matriksini sentezleyip, kalsifikasyonunu sağlarlar^{9,12}. Kemikleşmenin başladığı bu bölgelere birincil kemikleşme merkezi denir. Osteoblastlar oluşan kemik adacıkları ve trabeküllerin yüzeylerinde bir sıra halinde dizilirler. Trabeküllerdeki kollajen lifler gelişigüzel dizilmişlerdir. Kemik oluşumunun başlangıç safhasından sonra kemik yüzeyinde bulunan osteoblastlar hücreler arası madde ve kollajen liflerinin üretimini artırarak osteositlere dönüşüp kendilerini lakünelara haps ederler. Bu süreç ile kemiğin kalınlığı giderek artar. Yüzeyde osteoblast sayısının yeterliliği osteoblastların mitoz ile bölünmeleri ve çevre bağ dokusunda bulunan mezenşimal hücrelerin farklılaşması ile sağlanır^{9,10,12}. Kapillerler çevresinde oluşmaya başlayan kemik trabekülleri giderek büyür ve birbirleriyle birleşerek ağ şeklindeki spongiöz kemik dokusunu yapar. Bu yapı çevreye doğru ışınal tarzda yayılırken, kemik trabekülleri arasındaki boşlukları dolduran primitif mezenşimal hücreler kemik iliği hücrelerini meydana getirir. Spongiöz kemik yeterli büyüklüğe ulaştığında, içinde kemikleşmenin olduğu mezenşim membranının periferik kısmı

periosteuma dönüşür. Periosteumdaki osteoprogenitör hücreler spongiyöz kemik etrafında dizilir ve osteoblastlara dönüşürler. Bunlar hücreler arası maddeyi salgılayıp osteositlere dönüştükçe, yerleri periosteumun bağ dokusu hücrelerinden farklılaşan yenileri ile doldurulur. Sonunda spongiyöz kemik kitlesi periostun oluşturduğu kompakt kemik dokusu tarafından tabakalar şeklinde çevrelenmiş olur¹¹.

İntramembranöz kemikleşme genel olarak kısa kemiklerin gelişmesinde ve uzun kemiklerin kalınlaşmasında rol alır. Kafatası kemiklerinden frontal ve paryetal kemiklerin tamamı, oksipital ve temporal kemiklerin bir kısmı, yüz kemiklerinden ise mandibula ve maksillanın bir kısmı intramembranöz kemikleşme ile gelişir^{9,10,11,12}.

Endokondral Kemikleşme

Vücuttaki kemiklerin çoğu endokondral kemikleşme ile oluşur ve uzar. Bu kemikleşme süreci gebeliğin 12. haftasından başlayarak büyümenin durduğu olgunlaşma dönemine kadar devam eder^{10,13}. Süreç temel olarak mezenşimal hücrelerin kümeleşmesi ve fibroblastik hücrelerden oluşan ince bir tabaka (perikondriyum) tarafından sarılması ile başlar¹⁴. Primitif mezenşimal hücreler kondroblastlara farklılaşarak yetişkin kemiğin kabaca şeklini belirleyen hiyalin kıkırdak taslağını oluştururlar^{10,13}. Hiyalin kıkırdak taslağın kalınlaşması appozisyonel büyüme ile sağlanır. Appozisyonel büyüme, taslağı çevreleyen farklılaşmamış mezenşimal hücrelerin kondroblastlara dönüşmesi ile gerçekleşir. Hiyalin kıkırdak modelin uzunlamasına büyümesi ise interstisyel büyüme ile olur. Bu büyüme kondrositlerin mitotik çoğalması ve en sık tip 2 olmak üzere tip 9, 10, 11 ve 13 kollajen ile proteoglikanlardan oluşan hücreler arası maddenin üretilmesi ile sağlanır^{10,15}.

Kıkırdak taslak yapılıırken dış kısmındaki kondrositler nonhipertrofik, iç kısmındakiler hipertrofik kondrositlere farklılaşırlar. Kıkırdak taslağın oluşumu ve büyümesinde aktif rolü olan hücreler nonhipertrofik olanlardır. Bu hücreler dinlenip gerektiğinde aktivite kazanan, çoğalan, kollajen ve proteoglikanlar gibi matriks bileşenlerini sentezleyen ve hipertrofik kondrosit sayısını ayarlayan hücrelerdir. Nonhipertrofik kondrositler Runt ailesi transkripsiyon faktörlerinin (Runx2 ve Runx3) etkisiyle aktivitelerini ve bölünme yeteneklerini kaybederler ve genişleyerek hipertrofik kondrositlere dönüşürler^{14,16,17}. Hipertrofik görünümün nedeni sitoplazmada glikojen ve lipid birikiminin artması ve hücre

çekirdeğinin şişmesidir. Bu evrede hücre içi alkalen fosfataz enzim aktivitesi artmış bulunmaktadır¹¹. Hipertrofik kondrositlerin sitoplazmaları zamanla vakuolleşir, çekirdekleri piknotik görünüm kazanır ve çevrelerindeki kıkırdak matriks azalır. Bu aşamada alkalen fosfataz enzimi hücre dışına çıkararak kıkırdak matrikse kalsiyum fosfat kristallerinin çökmesine neden olur. Hipertrofik kondrositlerde geriletici değişikliklerin başlaması ve kıkırdak matriksin kalsifiye olması sonucu besin maddelerinin difüzyonu azalır ve giderek kondrositlerin ölümüne yol açar^{9,10}. Kondrositlerde oluşan tüm bu değişikliklerle birlikte, kıkırdak taslağı çevreleyen perikondriumun altındaki osteoprogenitör hücreler, diafiz orta bölgesinde osteoblastlara dönüşür^{9,10,13}. Osteoblastlar bu bölgede intramembranöz kemikleşme yoluyla kemik halkası veya kemiksel yaka denen bir tabaka oluştururlar. Kemiksel yaka diafiz boyunca her iki yöne doğru uzamaya ve kalınlaşmaya başlayarak diafizin kalınlığını artırır. Yeni oluşan kemik dokuyu saran perikondrium da artık periosteum adını alır¹³. Yeni oluşan kemiksel yaka besin maddelerinin difüzyonuna engel olduğundan bu bölgedeki hipertrofik kondrositler dejenere olmaya başlar. Dejenere kondrositlerin kıkırdak matriks devamlılığını sağlama yetenekleri azalır ve kalsiyum fosfat çökmesi ile kıkırdak matriks kalsifiye olur^{9,12}.

Kemiksel yaka, kıkırdak taslakta sonradan meydana gelecek olan vasküler invazyon için başlama bölgesidir. Kıkırdak taslağın merkezindeki kondrositlerden damarlanmayı uyaran VEGF ve damarlanmayı kısmen düzenleyen, kondrosit yaşamı için gerekli olan hipoksiyi indükleyen faktörlerin sentezlenmesi periosteumdan angiogenezisi başlatır^{16,18,19}. Periosteumdan kaynaklanan osteojenik tomurcuğun kan damarları, osteoklastlar tarafından kemiksel yakada açılan deliklerden geçerek, hipertrofik kondrositleri çevreleyen kalsifiye kıkırdak matriks içine yayılır. Proteaz enzimlerinden matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) salınması ile kıkırdak matriks parçalanır. Hipertrofik kondrosit kaynaklı VEGF, kondroklast, damar endotel hücreleri ve osteoblastlar üzerindeki reseptörlerine bağlanarak damar invazyonunu kolaylaştırır¹⁶. Kondroklastlar MMP-9 sentezleyen hücreler olup kemik iliği kökenlidir²⁰. Oluşan kan damarları, ileride oluşacak kemiğin merkezine doğru ilerler ve bu bölgeye osteoprogenitör hücreler ile kan öncül hücrelerinin gelmesini sağlar. Osteoprogenitör hücreler osteoblastları oluşturur. Osteoblastlar, kalsifiye kıkırdakın düzensiz yüzeyi üzerinde toplanarak kemik matriksini sentezlerler.

Böylece birincil kemik sentezi kalsifiye olmuş kıkırdak artıkları üzerinde başlar^{9,12,13}. Diafiz merkezindeki bu kemik birikimine birincil kemikleşme merkezi adı verilir. Bu olay kemiğin her iki ucuna doğru ilerler. Kıkırdağın kalsifikasyonu, buna eşlik eden hücresel değişikliklerle birlikte birincil kemik iliği boşluklarının oluşumu ile sonuçlanır. Bunlar daha sonra birleşerek diafiz içerisinde ikincil kemik iliği boşluğu olarak adlandırılan tek büyük boşluğu meydana getirirler¹².

İkincil Kemikleşme Merkezleri

Endokondral gelişimin bir diğer parçası, birçok kemikte bulunan ikincil kemikleşme merkezlerinin oluşumudur. İkincil kemikleşme merkezi, kemik uçlarında epifizlerin düzgün sferikal şekilli olmalarını sağlar. Epifizdeki şekil ve büyüklük, kemikler arasındaki bağlantıda önemli rol alıp, fonksiyonel iskelet oluşumu için gereklidir²¹. İkincil kemikleşme merkezlerinin oluşumu farklı zamanlarda tamamlanır. Oluşumları insan uzun kemiklerinde doğumdan sonra başlar. Epifizlerin hyalin kıkırdağı içinde, diafizlerin birincil kemikleşme merkezlerinin oluşması sırasında görülen aynı olaylar zinciri sonucunda önce üst epifizde, sonra alt epifizde ikincil kemikleşme merkezi meydana gelir. Ancak ikincil kemikleşme merkezinin oluşması sırasında birincil kemikleşme merkezi oluşumundan farklı olarak kemiksel yaka meydana gelmez¹¹. İkincil kemikleşme merkezinin oluşumu sırasında, epifizin periferinden merkeze doğru damarların ilerlediği gözlenir. Merkezden perifere doğru, kalsifiye kıkırdak doku ortadan kaldırılır. Kıkırdak artıklarının ortadan kaldırılmasına paralel olarak osteoblastlar tarafından kemik dokusu oluşumu ile bu bölge ışınsal olarak genişler²².

Uzun Kemiklerde Uzunlamasına Büyüme

Kemiğin uzunlamasına büyümesi, büyüme (fizis) plağından gerçekleşir. Fizis plağının kondrositleri çoğalıp kemik oluşumu işlemine katılırlar. Çoğalma epifizyal tarafta olurken, endokondral kıkırdak dokunun kemik dokusu ile yer değiştirmesi diyafizyal tarafta olur²³. Kıkırdak çoğalması ve kemiğe dönüşme hemen hemen aynı hızla meydana geldiğinden epifiz kalınlığı sabit kalır. Büyüme durduğunda kıkırdak çoğalması olmaz ve fizis plağı kemikleşir. Sonuç olarak epifiz ve diafiz birleşir. Bu kısımdaki kemik oldukça dens olup, epifizyal çizgi adını alır. Bundan sonra uzunlamasına büyüme olmaz^{10,12}.

Büyüme Plağı

Büyümesini tamamlamamış kemiklerin büyüme plaklarında endokondral kemik oluşumu gerçekleşir. Uzunlamasına büyümenin regülasyonu, büyüme

plağına etki eden sistemik hormonlar ve lokal etkili peptit büyüme faktörleri aracılığıyla olur. Bu moleküller, kondrosit büyüklüğü, matriks komponentleri, enzim sekresyonu, büyüme faktörleri ve reseptör ekspresyonu üzerinde etki yapar^{1,24}.

Büyüme Plağı Morfolojisi

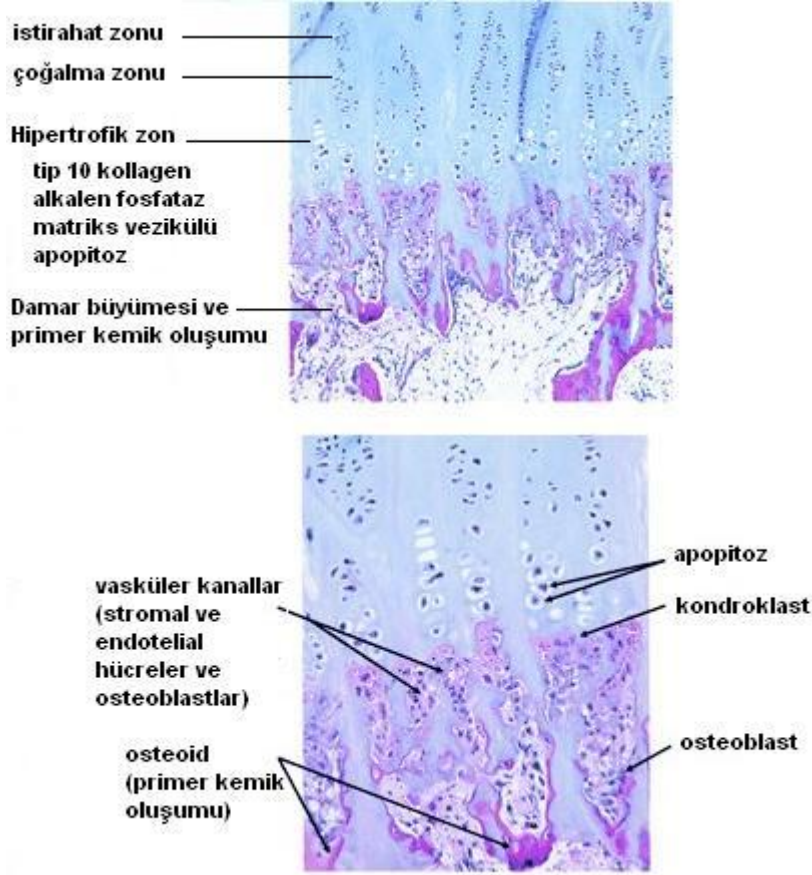
Büyüme plağı içerdiği kondrositlerin morfolojik ve biyokimyasal statüsüne göre istirahat, proliferatif ve hipertrofik olmak üzere üç ana zona ayrılır (Şekil 1)^{1,24}.

İstirahat zonu ikincil kemikleşme merkezine yakın taraftaki kısım olup görevi tam olarak aydınlatılamamakla birlikte aktivite kazanacak kondrositler için kaynak görevi gördüğü düşünülmektedir. Ekstrasellüler matriksten zengin hücre sayısı azdır. Hücreler iyi gelişmiş endoplazmik retikulumları nedeniyle aktif protein sentezi yaparlar. Hücresel çoğalma seyrek¹. Ekstrasellüler matriks içeriğini asıl olarak kollagenler, proteoglikanlar ve diğer kollagen olmayan proteinler oluşturur. Matriks mineralizasyon işlemine katılmayan çok sayıda matriks vezikülü bulundurur. Matriksteki proteoglikanların kümeler şeklinde (decorin ve biglycan) olması mineralizasyonu engeller. Matriks düzensiz dizilim gösteren başta tip 2 olmak üzere tip 9 ve 11 kollagenler içermektedir^{1,24}. Bu katman uzunlamasına kemik büyümesinin süreçleri olan hücre çoğalması, matriks sentezi ve kalsifikasyona aktif olarak katılmaz¹.

Çoğalma zonu histolojik olarak longitudinal kolonlar oluşturan mitotik aktivitesi fazla hücrelerden oluşur. Bu zondaki hızlı çoğalan kondrositlerin sitoplazmasında yaygın endoplazmik retikulum ve glikojen depoları vardır. Bu tabakadaki hücrelerin protein sentez kapasiteleri diğer 3 zona göre yüksektir. Hücre içi kalsiyum oranı istirahat zonu hücreleri ile aynıdır. Matriksdeki iyonize kalsiyum oranı yüksek olmasına rağmen aktif olarak mineralizasyon olmaz. Kollagen fibril ve matriks vezikülleri düzenli değildir. Bu zonun fonksiyonu matriks sentezi ve hücresel farklılaşmayı sağlayarak uzunlamasına büyümeye katkıdır^{1,24}.

Hipertrofi veya olgunlaşma zonu çok genişlemiş kondrositler içerir. Sitoplazmalarında yoğun olarak glikojen bulundurur ve en yüksek glikolitik enzim aktivitesine sahip olan kısımdır^{1,10,24}. Kondrositler son farklılaşma aşamasına ulaşmış ve yüksek alkalen fosfataz aktivitesi içerirler. Bu katmanda tip 10 kollagen sentez ve sekresyonu, nötral proteaz sekresyonu ve

mineralizasyon gerçekleşir^{1,24}. Matriks vezikülleri kondrositlerin plazma membranında tomurcuk şeklinde bulunur ve ekstrasellüler matriks etrafında mineralizasyon için bir nidus oluşturur.



Şekil 1; İnsan büyüme plağının histolojik görünümü.

Matriks Sentezi ve Hücre Proliferasyonun Düzenlenmesi

Matriks komponentlerini kondrositler sentezler ve hücreler arası boşluğa salgılar. Bu sentez ve sekresyon üzerinde birçok faktör etkilidir. Ekstrasellüler matriksi tip 2, 9, 10 ve 11 kollagenler, proteoglikanlar (decorin ve biglycan) ve diğer kollagen olmayan proteinler (cartilage oligomeric protein; COMP) oluşturur. Kondrositlerdeki transkripsiyon faktörü olan Sox 9, matriks proteinlerinin sentezinde rol oynar^{24,25}.

Son çalışmalarla büyüme plağındaki kondrosit çoğalmasını lokal feedback aracılığıyla 3 molekülün düzenlediği saptanmıştır. Bu moleküller; paratiroid

hormonla ilişkili protein (PTHrP), Indian hedgehog (Ihh), ve değiştirici büyüme faktörü-beta (TGF- β)^{1,14,24}.

Periartiküler bölgedeki hücreler PTHrP sentezlerler. Paratiroid hormonla ilişkili protein reseptörleri primer olarak prehipertrofik ve alt proliferatif hücrelerde bulunur. Kondrositlerdeki hipertrofik değişim sırasında Ihh salınır. Indian hedgehog periartiküler ve perikondriumdaki hücreleri uyararak PTHrP salınımını artırır. Indian hedgehog ayrıca perikondriyal bölgeden TGF- β salınımını da artırır. Bu büyüme faktörü PTHrP sentez ve salınımını artırır. Sentezi artan PTHrP kondrositlerde meydana gelecek hipertrofiyi direkt olarak inhibe eder^{14,26,27}. İn vitro çalışmalarında TGF- β 'nin, maturasyon inhibisyonu, hücre hipertrofisi, tip 10 kollagen ekspresyonu ve alkalen fosfataz aktivitesinin güçlü inhibisyonunda rol aldığı gösterilmiştir^{28,29}. Yapılan çalışmalarda Smad 3 geni sorunu olan farelerde doğumda tamamen normal bir iskelete sahip olmalarına karşın 3. haftada kıkırdak anormallikleri sonucu büyüme plağında erken kondrosit hipertrofisi, hücre organizasyonunda bozulma ve sonuç olarak uzunlamasına büyümede azalma gözlenmiştir³⁰.

Kondrosit Maturasyon ve Hipertrofisi

Kondrositlerin yaşamı istirahat, çoğalma ve mineralizasyon ile programlı hücre ölümünün gerçekleştiği hipertrofi aşamalarından oluşur³¹. Kondrosit hipertrofisi uzunlamasına kemik büyümesinde önemli rol oynar. Uzunlamasına büyümenin %44-59'unu kondrosit hipertrofisi, kalan kısmını matriks sentezi ve kondrosit çoğalması oluşturur. Ayrıca büyümesi farklı olan kemiklerde hipertrofik kondrosit oranlarının farklı olduğu gösterilmiştir. Örneğin büyümesi hızlı olan femurda bu oranın radiusdan daha fazla olduğu gösterilmiştir^{32,33}.

Hipertrofik kondrositlerin en önemli görevi ekstrasellüler matriksi için kalsifikasyon hazırlamaktır. Bu hücreler tip 10 kollagen ve yüksek düzeyde alkalen fosfataz sentezlerler³⁴. Alkalen fosfataz matriks kalsifikasyonu için gereklidir ve matriks veziküllerinde yüksek konsantrasyonda bulunur. Alkalen fosfataz yüksek fosfat konsantrasyonunu sağlar. Alkalen fosfataz eksikliğinde hipofosfatazya, mineralizasyonda azalma, büyüme plağında genişleme ve defektif mineralizasyon görülür³⁵.

Kondrosit farklılaşması ve hipertrofisi uzunlamasına büyümedeki esas basamaktır. Bunun üzerine yapılan yoğun araştırmalar sonucunda şu sonuçlara varılmıştır^{36,37};

endokondral kemikleşme yolunda kondrositler hipertrofi ve maturasyona uğramalıdır,

farklılaşmadaki negatif regulasyon ve hipertrofi kritik öneme sahiptir, kontrol mekanizması embriyonel dönemde planlanır ve etkinliği olgunlaşma sonuçlanıncaya kadar devam eder.

izole kondrosit kültürlerinde BMP varlığında hipertrofi, tip 10 kollagen sentezi ve alkalen fosfataz enzim aktivitesinin arttığı görülmüştür^{36,38}. Kemik morfogenezik protein sinyali engellendiğinde kondrosit maturasyonu inhibe olur. İn vivo çalışmalar BMP antagonisti olan noggin ve chordin'in gelişen civcivlerde kondrosit hipertrofisi ve maturasyon için gerekli gen ekspresyonunu engellediği göstermiştir^{38,39}.

Transkripsiyon faktör core binding faktör-1 (CBFA-1) kondrojenoziste Sox 9 ile benzer role sahiptir. Bu faktör kondrositlerin terminal farklılaşmasını tetikler. Bu faktörün geninden yoksun olan hayvanlarda hipertrofik kondrositler görülmez⁴⁰. Son çalışmalar tip 10 kollagen sentezlenmesini sağlayan gen bölgesini de CBFA-1 tarafından tetiklendiğini göstermiştir⁴¹.

Matriks Mineralizasyonu

Matriksin fonksiyonu kalsifikasyonu sağlamak ve osteoblastlar tarafından kemik oluşturulması için gerekli taslağı meydana getirmektir. Mineralizasyon hipertrofik kondrosit kolonları arasında meydana gelir ancak aynı kolondaki kondrositler arasında olmaz⁴². Matriks vezikülleri 10 nm çapında membranla çevrelenmiş tomorcuklar halinde kondrosit, osteoblast ve odontoblastlardan salınır³⁸. Bu veziküller esas olarak büyüme plağının hipertrofik bölgesinden salınırlar ve kalsifikasyon için kritik rol oynarlar⁴³. Matriks vezikülleri kalsiyum bağımlı kalsiyum kanal molekülleri olan annexinler aracılığıyla kalsiyumu biriktirirler. Annexin 2, 5 ve 6 matriks veziküllerinin lipid bariyerleri içinde bulunurlar^{43,44}. Matriks vezikülleri enzim olarak alkalen fosfataz ve matriks metalloproteinaz içerirler. Alkalen fosfatazın mineralizasyondaki rolü tam olarak açıklanmamıştır. Bu enzimin pirofosfatın iki molekül ortofosfata dönüşmesinde rol oynadığı bilinmektedir. Pirofosfat hidroksiapatit kristallerinin oluşumunu

inhibe eder. Pirofosfatın alkalen fosfataz tarafından hidrolizi matriks veziküllerinin mineralizasyonunu stimüle eder³⁸.

Matriksin katabolize olup normal kalsifikasyonun gerçekleşmesi, kemik oluşumu ve angiogenesiste vitamin-D, alkalen fosfataz ve MMP'ları rol oynar. Vitamin-D alkalen fosfataz ve MMP aktivitesini artırır⁴⁵. Vitamin-D eksikliğinin defektif mineralizasyona ve büyüme plağı genişlemesine yol açtığı bilinmektedir⁴⁵. Bu enzim matriks katabolizmasından ve dönüşümünden sorumludur. Matriks metalloproteinaz 13 hipertrofik kondrositlerde yapılır ve matriks vezikülleri içinde depolanır. Matriks mineralizasyonu MMP'ler tarafından tip 2 kollagen yüzeyinde mineralizasyon için klivaj açıldıktan sonra gerçekleşir^{46,47}. Matriks veziküllerinin içerdiği inaktif TGF- β , MMP-13 tarafından aktif formuna dönüştürülür⁴⁸. Matriks metalloproteinazların angiogenesis üzerinde de etkisi vardır²⁴.

Kondrosit Apoptozu

Büyüyen ve gelişen tüm organizmalarda hücrelerin çoğalması, farklılaşması ve apoptozu (programlanmış ölümü) vardır. Apoptoz büyüme plaklarında terminal farklılaşmaya uğramış kondrositlerde olur⁴⁹. Apoptoza uğrayan ve ortadan kaldıran kondrositlerin yeri yeni kan damarları ve kemik iliği hücreleri tarafından doldurulur^{50,51}. Apoptozu başlatan kaspas enzimleridir. Bu enzimler sistein proteaz olup spesifik hedef proteinlerinde klivaj açarlar⁵².

Damarlanma

Büyüme plağı esas olarak avaskülerdir ve oksijen ile besin gereksinimini komşu metafizer alandan sağlar⁵⁴. Vasküler endotelial büyüme faktörü damarlanma için gereklidir. Bu faktör 44-kd ağırlığında bir protein olup vasküler endotelial hücreleri hedef alıp, bu hücrelerin çoğalması, migrasyonu ve yeni kan damarları yapmasını aktive eder. Hipertrofik kondrositlerden sentezlenirken, istirahat ve proliferatif kondrositlerden salınmaz^{55,56}. Kalsifiye kıkırdak vasküler invazyonu engellediği için öncelikle bunların osteoklast ve/veya kondroklastlar tarafından rezorbe edilmesi gerekir⁵⁷.

Fizis Kapanması

İskelet sistemi matüriteye yaklaştıkça uzunlamasına büyüme hızı yavaşlar ve büyüme plağındaki kondrositlerin çoğalma hızı azalır. Hipertrofik hücre kolon sayısı ve büyüklüğü azalır. Puberte sonrasında epifiz ile metafiz füzyonu gerçekleşir ve büyüme büyük oranda tamamlanır⁵⁸. Son çalışmalar fizis

kapanmasının her iki seks grubunda da östrojenin kontrolü altında gerçekleştiğini göstermiştir⁵⁹.

Kemik Büyümesine Etkili Faktörler

Kemik büyümesini arttıran faktörler; hormonlar, büyüme faktörleri, kırık ve osteotomilerdir^{1,60,61,62}.

İnsülin benzeri büyüme faktörleri, (IGF) düzenleyici sistem-2 ligand (IGF-1,IGF-2), bu ligandların reseptörleri (IGF-1R,IGF-2R), asit değişken subunit (acid labile subunit-ALS) ve 6 tane yüksek affiniteli insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteini içerir⁶⁴. Bu komponentler hep birlikte hücrel farklanma, büyüme çoğalma, migrasyon ve hücrenin apoptozise karşı yaşamsal etkilerini içeren önemli biyolojik sonuçları kontrol eder⁶⁵. İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 ve IGF-2 hemen tüm hücrelerde gereksinim durumunda sentezlenirler ancak depo edilmezler. Hedef hücrelerdeki etkilerini her ikisi de IGF-1R aracılığı ile yapar⁶⁴. İnsülin benzeri büyüme faktörleri kemik dokunun gelişmesinde ve onarımında önemli rol oynamakla birlikte bu mekanizmalar günümüzde tam olarak anlaşılammıştır. Bu faktörler iskelet sistemi tarafından sentezlenen en yaygın büyüme faktörleri arasındadır⁶⁶. İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 ve IGF-1R, kondrositler, osteoblastlar ve osteoklastlar tarafından sentezlenmektedir^{24,67}. Bu faktörler az farklılaşmış hücrelerde mitojenik etki yaratırlar. Osteoblastlarda osteokalsin üretimi, alkale fosfataz aktivitesi ve tip 1 kollajen sentezini arttırlar⁶⁸.

Fibroblast büyüme faktörleri 23 üyelik bir protein ailesi olup, endokondral ve intramembranöz kemikleşmede etkilidirler. Fibroblast büyüme faktörü-1 ve FGF-2 prototip olup en sık araştırılanlardır⁶⁹. Tirozin kinaz süperfamilyasına ait 4 ayrı FGF reseptörü tanımlanmıştır. Bu reseptörler hücre dışı ligand bağlayıcı kısım, transmembran kısım ve hücre içi tirozin kinaz bölgesi olmak üzere 3 komponentten oluşur⁶³. Yapılan çalışmalarla FGF'lerin embriyonik ve postnatal dönemde kemik oluşumunda etkili olduğu gösterilmiştir⁷⁰. Özellikle kök hücre ve farklılaşmış hücrelerde etkili olan bu faktörler, hücre migrasyonu, çoğalması, farklılaşması ve morfolojik ile fonksiyonel açıdan değişiminde etkilidir. Ayrıca bu faktörlerin mezenşimal hücrelerin kondrosit ve osteoblasta farklılaşmasını da etkilediği, kondrosit çoğalması ve kondrositlerin terminal farklılaşmasını düzenlediği gösterilmiştir⁷⁰. Monocilla ve ark.⁷¹ büyüyen sıçanlarda sistemik FGF-2 uygulamasının bifazik etkili olduğunu göstermişlerdir. Bu faktörün düşük

dozda verilmesi ile sıçanlarda büyüme plağı kondrositlerinde hücre çoğalması ve uzunlamasına kemik büyümesinin arttığı gözlenirken, yüksek dozda verilen FGF-2'nin ters yönde etki oluşturduğu saptanmıştır. Baron ve ark.⁷² büyüme plağının metafizyal sınırına FGF-2 infüzyonu yaparak bu bölgede vasküler invazyonun ve kemikleşmenin arttığını göstermişlerdir. Aynı zamanda bu faktör birincil ve ikincil kemikleşmenin erken dönemlerinde, angiogenezis için gerekli olduğu ileri sürülmüştür⁷².

Değiştirici büyüme faktörü-beta memeli türlerinde üç izoformu olup morfogenetik işlev gören bir proteindir. Üç tip reseptörü tanımlanmıştır. Hücre membranında tip 1 ve 2 reseptörleri bulunur. Tip 2 reseptör, tip 1 reseptörünün uyarılmasını sağlayarak, hücre içi uyarı kaskadını başlatan SMAD reseptörünün transfosforilasyonunu sağlar. Bu süreç ile proteinin hücre çekirdeğine taşınması ve gen transkripsiyonu düzenlenir⁷³. Bu büyüme faktörü birçok hücrede; çoğalma, farklılaşma, migrasyon, apoptozis ve ekstrasellüler matriks üretiminin düzenlenmesinde rol oynar. Ayrıca organogenezde de etkili olduğunu ileri süren çalışmalar vardır⁷⁴. Kondrosit kültürlerinde TGF- β 'nin ekstrasellüler matriks sentezinde rol aldığı, proteoglikanların sentezlenmesini, bunların büyüklüklerini ve sülfatlanmasını artırdığı saptanmıştır⁷⁵. Kemik morfogenetik proteinler, TGF- β süperfamilyasından olup kemik hücreleri üzerinde multifonksiyonel (büyüme, farklılaşma, apoptoz) etkileri vardır. İskelet dokusunda özellikle BMP-2, 4, 6 ve 7 önemli rol oynarlar ve günümüzde kırık kaynaması için kullanılırlar⁷⁷.

Büyüme hormonu (GH), hipofiz bezinden salınan peptid yapıda bir hormon olup, temel olarak kondrosit çoğalmasını artırır¹. Somatomedinler aracılığı ile etki yapan GH, lokal olarak büyüme plağına uygulandığında uzunlamasına büyümeyi arttırdığı görülmüştür⁷⁹.

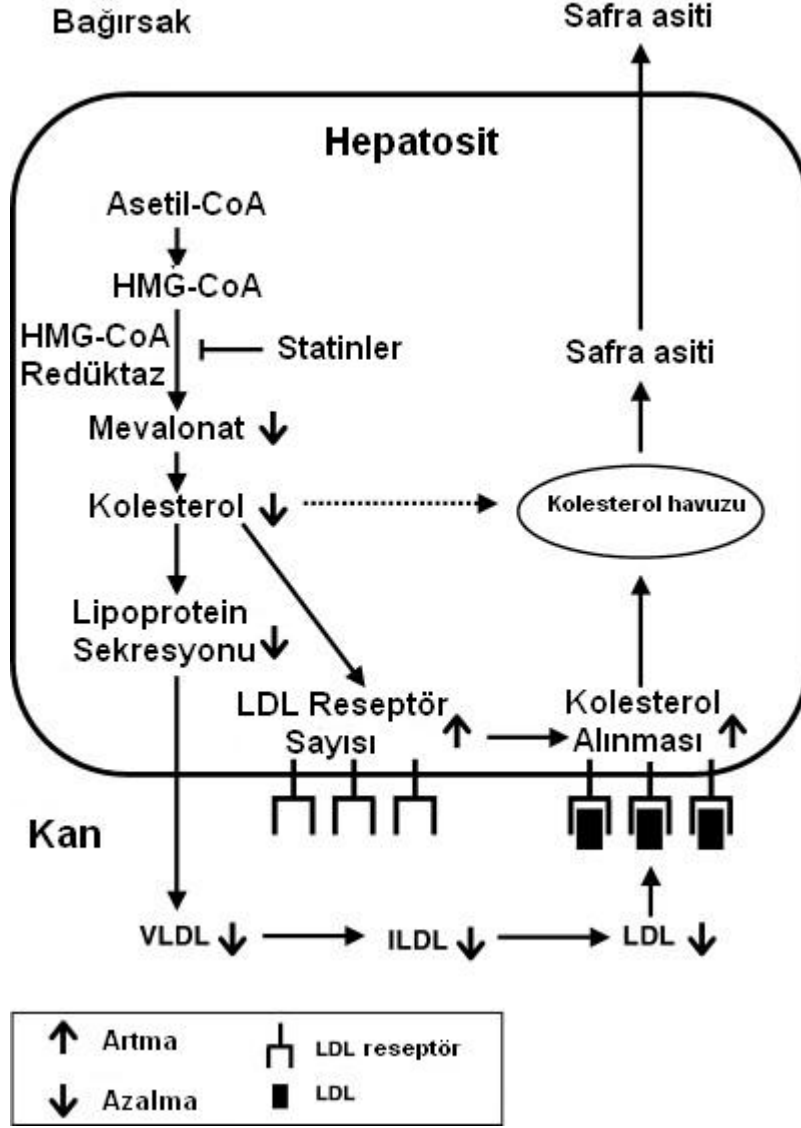
Glukokortikoidler, adrenal korteksten salınan steroid yapıda hormonlar olup, kondroprogenitör hücre çoğalmasını baskırlar. Bu hormonlar yüksek dozda verildiğinde kondrositlerin mitotik ve sentetik aktivitesini ve sonuçta uzunlamasına büyümeyi azaltırlar^{1,78}.

Tiroid hormonu, normal iskelet gelişimi ve maturasyonu için gereklidir. Hipotiroidizm uzunlamasına kemik büyümesi ve endokondral kemikleşmeyi azaltırken, hipertiroidizm her iki süreci aktive eder⁷⁸.

Östrojen, puberte öncesinde iskelet maturasyonunu aktive eder ve epifizyal füzyonu sağlar⁷⁸. Östrojen normal gelişim için gereklidir. Aromataz enzim eksikliği olan hastalarda puberteye kadar normal büyüme görülür fakat puberte döneminde olması gereken epifizyal füzyon olmaz⁸⁰.

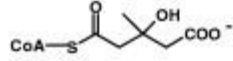
Statinler

Statinler esas olarak kolesterol sentezini spesifik olarak bloke eden farmakolojik ajanlardır. Hidroksi-metil glutaril koenzim A (HMG-KoA) redüktazın inhibitörleri statinler olarak isimlendirilir. Statinler, HMG-KoA'nın mevalonata dönüşümüne engel olurlar⁸¹. İlk defa antifungal ajan olarak üretilen statinler günümüzde birçok klinik durumun tedavisinde kullanılırlar. Doğal ve sentetik olmak üzere iki tip statin üretilmiştir. Statinler temelde karaciğerde kolesterol sentezini bloke ederek lipoprotein sentezini azaltırlar. Aynı zamanda hepatositlerde LDL reseptör ekspresyonunu artırır ve kandan kolesterolün daha fazla alınıp safra ile atılımını sağlarlar⁸² (Şekil 2).



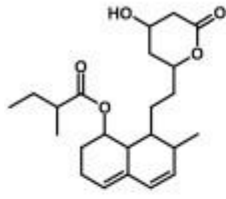
Şekil 2; Statinlerin kolesterol metabolizmasına etkisi.

Doğal statinler; mevastatin, lovastatin, simvastatin, pravastatin, sentetik olanlar; atorvastatin, fluvastatin, rosuvastatin, pitavastatin ve cerivastatindir. Statinler lipofilik (simvastatin, cerivastatin, fluvastatin ve atorvastatin) ve hidrofilik (pravastatin ve rosuvastatin) olmak üzere ikiye ayrılır. Lipofilik statinler kolaylıkla hücre membranını geçerken hidrofilik statinler hücre membranını geçmek için özel taşıyıcıya ihtiyaç duyarlar. Statinlerin yapısı, yarılanma ömrü ve güçleri farklıdır^{81,82}(Şekil 3).

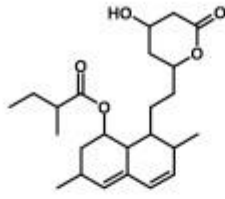


HMG-CoA : HMG-CoA redüktaz substratı

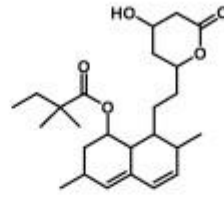
Doğal Statinler



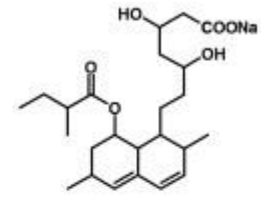
Mevastatin



Lovastatin

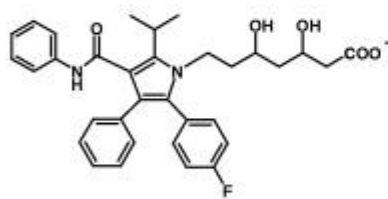


Simvastatin

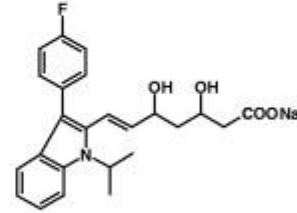


Pravastatin

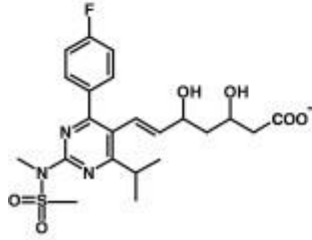
Sentetik Statinler



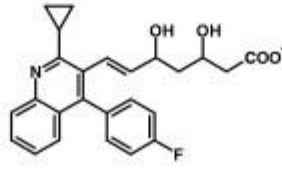
Atorvastatin



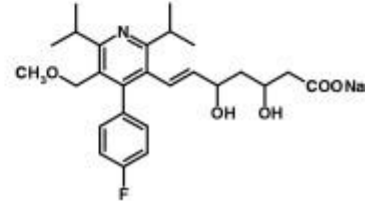
Fluvastatin



Rosuvastatin



Pitavastatin



Cerivastatin

Şekil 3; Statinlerin ve HMG-CoA'nın kimyasal yapıları. Mevastatin, lovastatin, simvastatin ve pravastatin doğal fermentasyon ürünü statinlerdir. Atorvastatin, fluvastatin, rosuvastatin, pitavastatin ve cerivastatin ise sentetik statinlerdir.

Yapılan klinik insan çalışmaları statinlerin serum kolesterolünü %15-40, LDL kolesterolü %20-60, trigliseridi %10-30 azalttığı ve HDL kolesterolü %5-15 artırdığı gösterilmiştir⁸⁴.

Statinler kolesterol sentez yolundaki izopreneidlerin sentezini de etkiler. İzopreneidler; küçük G proteinleri, Ras ve Ras benzeri proteinlerin (Rho, Rap, Rab, ve Ral) translyasyon sonrası modifikasyonlarında rol alır ve dolayısıyla birçok hücrenin fonksiyonlarını etkiler^{81,82,83}.

Statinler kolesterol düşürücü etkinin dışında birçok sistemik etkiye sahipler⁸². Bu etkiler;

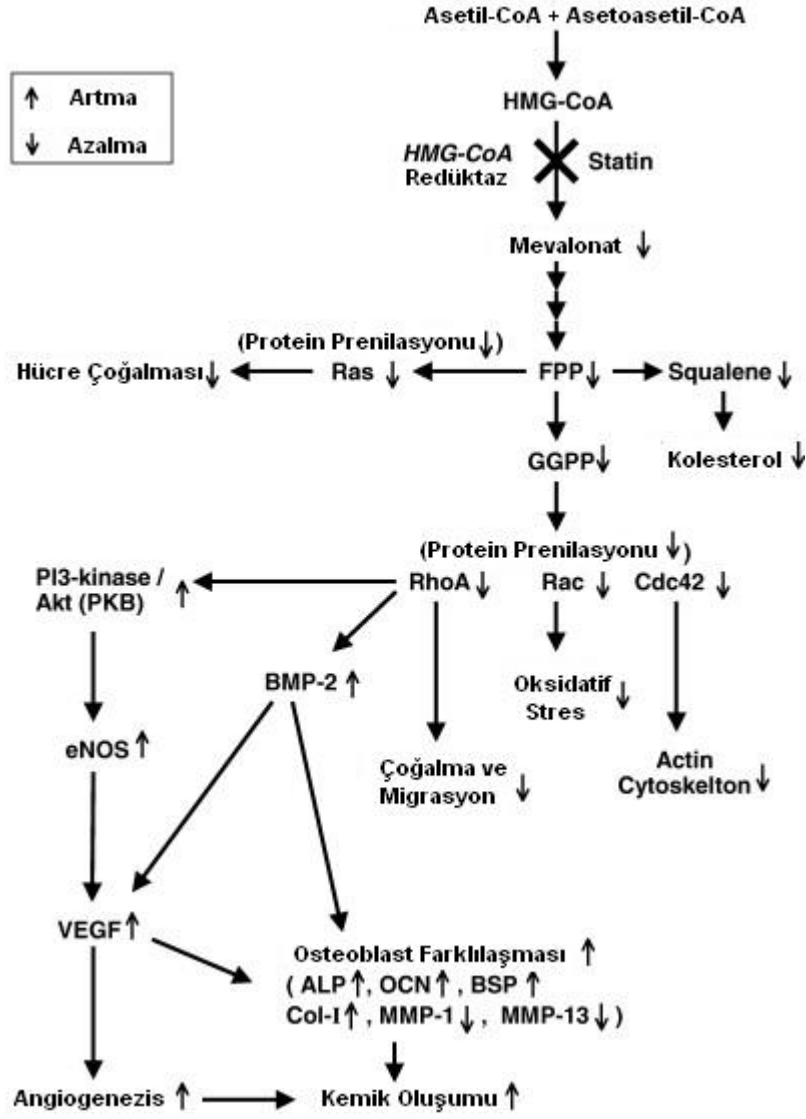
koroner arter hastalığını azaltmak,
aterosklerozisi azaltmak,
trombosit birikmesini ve trombüs oluşumunu azaltmak,
angiogenezi arttırmak,
beta-amiloid peptit birikimini azaltmak,
inflamasyonu azaltmak,
hücre çoğalmasını azaltmak,
T-lenfosit aktivasyonunu azaltmak,
ve kemik oluşumunu arttırmak şeklinde sıralanabilir.

Statinlerin endotel bağımlı nitrik oksit (eNO) sentezini arttırdıkları öne sürülmüştür. Nitrik oksit, kan akımı düzenlenmesinde ve vasküler homeostaz için temel mediatördür. Nitrik oksit sentezinin azalması ile vazokonstrüksiyona eğilim artar ve trombosit ile lökosit kümelenmeleri sonucu adezyon gerçekleşir⁸⁶.

İnflamatuar süreç, ateroskleroz ve koroner arter hastalığının başlaması ve ilerlemesinde kritik öneme sahiptir. Endotel hasarı durumunda hasar bölgesine lökosit ve makrofaj migrasyonu olur. Bu hücrelerin salgıladığı proinflamatuvar sitokinler, kemokinler ve adezyon molekülleri aterosklerotik lezyonun oluşmasına yol açar⁸². Statinler, aterosklerotik plakta toplanan hücre sayısı, P-selectin gibi adezyon moleküllerinin sentezi, IL 1 ve IL 6 gibi proinflamatuvar sitokin salınımı ve C-reaktif protein (CRP) oluşumunu azaltarak inflamasyonu baskırlar⁸⁷. Statinler; monosit/makrofaj infiltrasyonunu, düz kas hücre proliferasyon ve migrasyonunu ve MMP sekresyonunu baskılıyarak aterosklerotik plağın ilerlemesi ve yırtılmasını azaltırlar⁸².

Statinler günümüzde osteoporoz tedavisinde kullanılan anabolik ajanlardır. Osteoporoz özellikle menapoz sonrasında görülen, vertebra, kalça ve el bileğinde kırıklara yol açan yaygın bir problemdir. Temelinde kemik kitlesinde azalma ve trabeküler kemik yapısında bozulma vardır. Osteoporozda kullanılan rezorpsiyonu önleyici ilaçlar bifosfonatlar, östrojen, selektif östrojen reseptör analogu, kalsitonin ve D vitamini analoglarıdır^{82,83,85}. Trabeküler kemik yapısındaki değişimi düzeltmek ve kemik kitlesini artırmak için anabolik ajanlar diğer tedavi seçeneğidir. Anabolik ajan olarak paratiroid hormon, florid, stronyum ve büyüme hormonları kullanılır⁸². Statinlerin kemikteki biyolojik etkilerini ilk defa 1999'da Mundy ve ark.⁸⁸, in vitro ortamda osteogenezi

stimüle ettiğini göstererek, bildirmişlerdir⁸². İn vitro çalışmalarla, simvastatin'in alkalen fosfataz aktivitesi ve mineralizasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Statinler osteoblast fonksiyonunu gösteren kemik sialoprotein, osteokalsin ve tip 1 kollagen sentezini arttırlar. Matriks metaloproteinaz 1 ve 13 genlerinde ise ekspresyonun azalmasına yol açarlar^{81,89}. Statinler üzerine yapılan birçok çalışmada statinlerin BMP-2 nin aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir⁸¹⁻⁹⁰. Bilindiği gibi BMP'lerin kemik metabolizması üzerinde anabolik etkisi vardır^{1,24,38}. Kolesterol sentez yolunda oluşan izoprenoidler geranilgeranil pirofosfat (GGPP) ve farnesil pirofosfattır (FPP). Bu izoprenoidler heterotrimeric G proteinleri, küçük G proteinleri ve Rho, Rap, Rab veya Ral gibi Ras benzeri proteinlerin translyasyon sonrası modifikasyonunda rol alırlar. Statinler bu izoprenoidlerin oluşumlarını bloke eder. İzoprenoidlerin statinler tarafından bloke edilmesiyle BMP-2 aktivitesinde artış olur^{81,82}(Şekil 4).



Şekil 4; Statinlerin izoprenoidlerin oluşumunu azaltmak suretiyle ortaya çıkan biyolojik etkileri. Ras, Rho ve Rac gibi isoprenilasyon sinyal moleküllerinin azalması çeşitli sinyal yollarını etkiler. Statinlerin kemik oluşumuna etki mekanizması da gösterilmiştir (ALP; alkalin fosfat, OCN; osteokalsin, BSP ; kemik sialoprotein , Col-1 ; tip 1 kollajen , MMP-1 ; matriks metalloproteinaz-1, MMP-13 ; matriks metalloproteinaz-13).

Sugiyama ve ark.⁹¹ lipofilik statinler ile yaptıkları çalışmada insan osteosarkom hücrelerinde BMP-2 mRNA ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir. Fakat hidrofilik statinlerde BMP-2 mRNA artışı olmamıştır. Pluripotent embriyonik hücreler in vitro ortamda adiposit veya osteoblastlara diferansiyasyon olabilir. Phillips ve ark.⁹³ statinlerin BMP-2 ekspresyonunu stimüle

ederek osteoblastik diferansiasyonu arttırdığını göstermişlerdir. Bu artış, BMP-2 mRNA ekspresyonunun primer insan osteoblast hücrelerindeki artış aracılığıyla gerçekleşir. Bu stimülatör etki ortama verilen GGPP ile engellenmiştir.

Statinlerin kemik metabolizması üzerinde anabolik etkileri, BMP-2 aktivite artışından başka yollarla da oluşur^{82,90}. Simvastatin ve atorvastatin gibi lipofilik statinler proteinlerin prenilasyonunu azaltarak kolesterol sentez yolundaki fosfatidilinozitol-3 kinaz (PI3K) yolu aracılığıyla eNOS'u aktive ederek VEGF ekspresyonunu arttırmaları^{81,82,90}. VEGF'nin epifizlerde büyümeyi arttırdığı bilinmektedir^{55,56}. Osteoblast kültürlerinde ortama verilen lipofilik statinlerin VEGF-mRNA ekspresyonunu arttırmak suretiyle osteoblastik aktivite artış göstergeleri olan tip 1 kollagen ve ALP artışına yol açtığı tespit edilmiştir⁸¹. Damar hücresi kökenli büyüme faktörü, kemik üzerinde otokrin ve/veya parakrin etki ile angiogenezis, kemikleşme ve kemik döngüsünü artırır^{94,95}. Dolayısıyla VEGF statin bağımlı kemik oluşumunda önemli rol alır⁸².

Statinler aminobifosfonatlar gibi osteoklast fonksiyonlarını da baskırlar. Bu etkiyi, HMG-KoA redüktaz enzimini bloke ederek, mevalonat sentezini ve dolayısıyla GGPP oluşumunu engellemek yoluyla osteoklast apoptozunu arttırarak oluştururlar^{82,90,92,96}.

Puliripotent mezenşimal hücrelerin osteoblast, adipozit, kondrosit ve miyozit gibi farklı hücrelere dönüşüm kapasiteleri vardır. Bu farklılaşmayı esas olarak bazı transkripsiyon faktörleri kontrol eder. Runt-related transkripsiyon faktör-2/core-binding factor-a-1 (Runx2/Cbfa-1) osteoblastik farklılaşmada ya da osteogeneziste, peroksizom proliferatör-aktive edici reseptör (PPAR)-gama2 ise adipozit hücresi farklılaşmasında ve yağ dokusu oluşumunda kritik rol oynayan transkripsiyon faktörleridir⁹⁷. Osteoblast ve adipozit hücreleri ortak mezenşimal hücrelerden köken alır. İn vitro yapılan çalışmalar statinlerin adipojenik farklılaşmayı inhibe edip osteoblastik farklılaşmayı indüklediği görülmüştür⁹⁸. Statinler plüripotent mezenşimal hücrelerde PPAR-gama2'yi baskılayıp Runx2/Cbfa1'yi ise aktive ettiği görülmüştür. Böylece fare kemik iliği hücrelerinde osteoblastik farklılaşmanın arttığı gösterilmiştir⁸²⁻⁹⁸.

GEREÇ ve YÖNTEMLER

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı alındıktan sonra çalışmaya başlandı. Araştırmanın tüm aşamaları, Türk Veteriner Hekimliği Medikal Deontoloji Kanunu ve hayvan hakları ile ilgili Helsinki deklarasyonuna bağlı kalınarak gerçekleştirildi. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim Birimin'de üretilen 30 günlük 45 adet erkek Wistar albino cinsi sıçan seçildi. Denekler, sıcaklığı 20-22°C, nem oranı %45-65 ve 12şer saat gece ve gündüz koşulları sağlanan laboratuvar ortamında, 35x45x25 cm boyutlarındaki plastik kafeslerde barındırıldı. Denekler hazır pellet yem ve çeşme suyu ile beslendi. Deneye başlandığı sırada sıçanların ortalama ağırlıkları 54.2 (44-80) gram idi.

Çalışmamızda 4 grup (Tablo 1) oluşturuldu bunlar;

1) Sham grubu; 13 denekten oluşan bu gruba hiçbir müdahale yapılmayıp her iki femur ve tibianın doğal büyüme süreçleri izlendi.

2) Kontrol grubu; 12 denekten oluşan bu grubun sağ femur distal metafizine 0.2 ml distile su intraosseöz olarak enjekte edildi.

3) Atorvastatin-1 grubu; 10 denekten oluşan bu grubun sağ femur distal metafizine 0.2 ml distile su içinde çözülmüş 5 mg saf atorvastatin intraosseöz olarak enjekte edildi.

4) Atorvastatin-2 grubu; 10 denekten oluşan bu grubun sağ femur distal metafizine 0.2 ml distile su içinde çözülmüş 10 mg saf atorvastatin intraosseöz olarak enjekte edildi.

Tablo 1;Deney gruplarının sınıflandırılması

Grup adı	Denek sayısı	Yapılan girişim	Sakrifikasyon zamanlaması
Sham	13	Hiçbir müdahale yapılmadı, her iki femur ve tibianın doğal büyüme süreci izlendi.	0. gün (4 denek) 12. gün (3 denek) 24. gün (3 denek) 36. gün (3 denek)
Kontrol	12	Femur distal metafize sadece 0.2 ml distile su intraosseöz uygulandı.	12. gün (4 denek) 24. gün (4 denek) 36. gün (4 denek)
Atorvastatin-1	10	0.2 ml distile su+5 mg atorvastatin intraosseöz uygulandı.	12. gün (2 denek) 24. gün (3 denek) 36. gün (3 denek)
Atorvastatin-2	10	0.2 ml distile su+10 mg atorvastatin intraosseöz uygulandı.	12. gün (3 denek) 24. gün (3 denek) 36. gün (4 denek)

Deneklerimizde intraosseöz verilebilecek maksimum sıvı hacminin belirlenmesi ve bu hacimde çözülebilen maksimum atorvastatin miktarı literatür ışığı altında ve yapılan ön deneylerle belirlendi. Ön deney (yüksek doz anestezi altında tek sıçanda çalışıldı) ile 30 günlük sıçanın femur distal metafiz bölgesine dışarı taşırmadan maksimum 0.2 cc'lik sıvı hacminin enjekte edilebileceğini saptadık. Bu hacim sıvıda (distile su) çökelti oluşmamak kaydıyla maksimum 10 mg atorvastatinin çözülebildiğini saptadık. Statinler günümüzde hipolipidemik ajan olarak 10 mg/gün insan dozunda kullanılmaktadır. Bu maddelerin kemik yapıdaki etkileri ile ilgili deneysel dozları literatürde sadece üç çalışmada saptandı. Oxlund ve arkadaşları, sıçanlarda statinlerin kemik üzerindeki etkilerini araştırmak için 10mg/kg/gün simvastatin oral doz vermişlerdir¹⁰⁰. Leem ve ark. lipofilik bir statin olan lovastatini sıçanlarda 5mg/kg/gün dozunda intraperitonel uygulamışlardır¹⁰². Wong ve arkadaşları taşanlarda oluşturdukları kafa tası kemik defektine lokal statin olarak 0.2 ml hacimde çözülmüş 10 mg simvastatin tek doz şeklinde uygulamışlardır¹⁰¹. Biz bu çalışmamızda

atorvastatini benzer hacimde (0.2 cc distile su), ancak iki ayrı dozda (5 mg ve 10 mg) uygulamayı uygun gördük.

Sham grubu hariç tüm ratlarda intraperitoneal 50 mg/kg thiopentone sodyum ile anestezi sağlandıktan sonra sağ uyluk distaline lateral orta hat longitudinal insizyon yapıldı ve cilt ciltaltı dokusu geçilerek femur distal metafizi ortaya kondu. Tüm çalışma gruplarında insülin enjektör iğnesi standart bir şekilde lateral korteksten geçilerek intraosseöz yerleştirildi. Kontrol grubunda sağ femur distal metafizine 0.2 ml distile su intraosseöz enjekte edildi ve dokular kapatıldı. Çalışma gruplarında ise 0.2 ml distile su içinde çözülmüş 2 ayrı dozda atorvastatin (Atorvastatin-1 grubunda 5 mg, Atorvastatin-2 grubunda 10 mg) aynı teknik ile sağ femur distal metafizine intraosseöz olarak enjekte edildi ve dokular kapatıldı.

Enjeksiyon sırasında Atorvastatin-1 grubundan 2 sıçan öldü.

Sham grubundan 0. günde 4 ve 12, 24 ve 36. günlerde 3'er denek sakrifiye edildi.

Kontrol grubundan çalışmanın 12, 24 ve 36. günlerinde 4'er denek sakrifiye edildi.

Atorvastatin-1 grubundan çalışmanın 12, 24 ve 36. günlerinde sırasıyla 2, 3, ve 3 denek sakrifiye edildi.

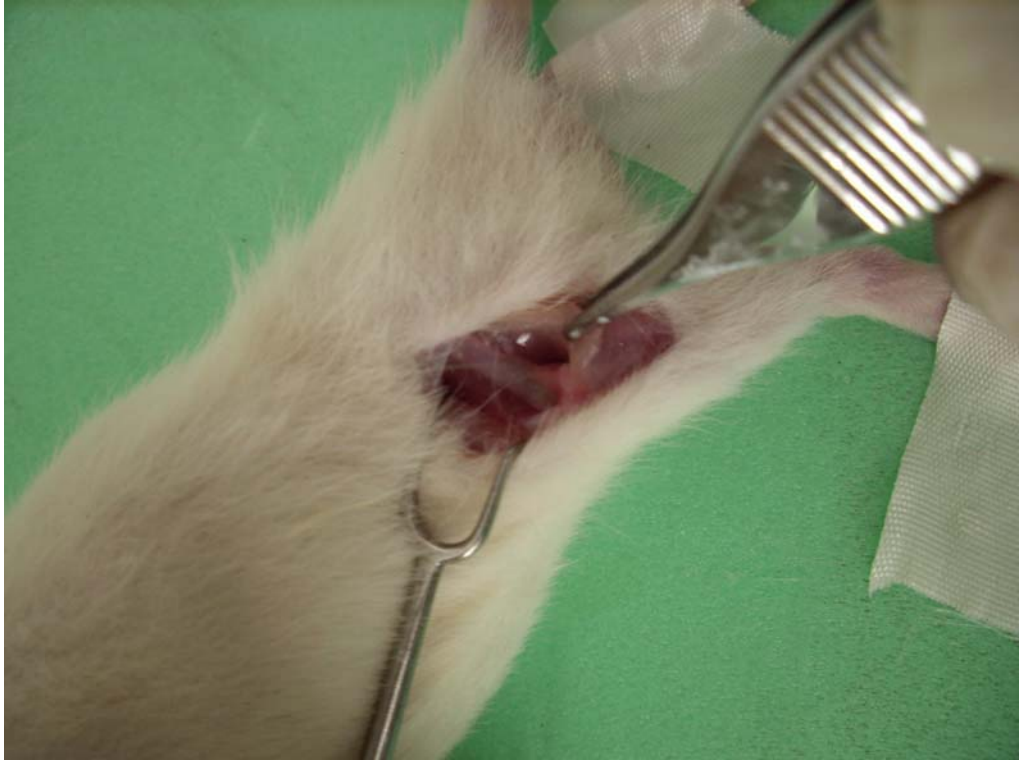
Atorvastatin-2 grubundan 12 ve 24. günlerde 3'er, 36. günde 4 denek sakrifiye edildi

Günlük izlemlerde deneklerin genel sağlık durumu, yürüme problemleri, lokal inflamasyon veya infeksiyon durumları kaydedildi. Sakrifikasyon zamanlarına göre her gruptan rastgele alınan sıçanlar intraperitoneal yüksek doz anestezi ile uyutularak, vücut ağırlıkları ölçülüp, kaydedildi. Göğüs kafesleri açılarak, insülin enjektörü ile kalp kanı alındı. Sakrifikasyon ağrısız ve insancıl bir şekilde sonuçlandırıldı. Kan örnekleri biyokimya ekibine teslim edildi. Daha sonra her iki femur ve tibia'nın disseksiyonu yapıldı. Femur ve tibia yumuşak dokulardan arındırıldı.

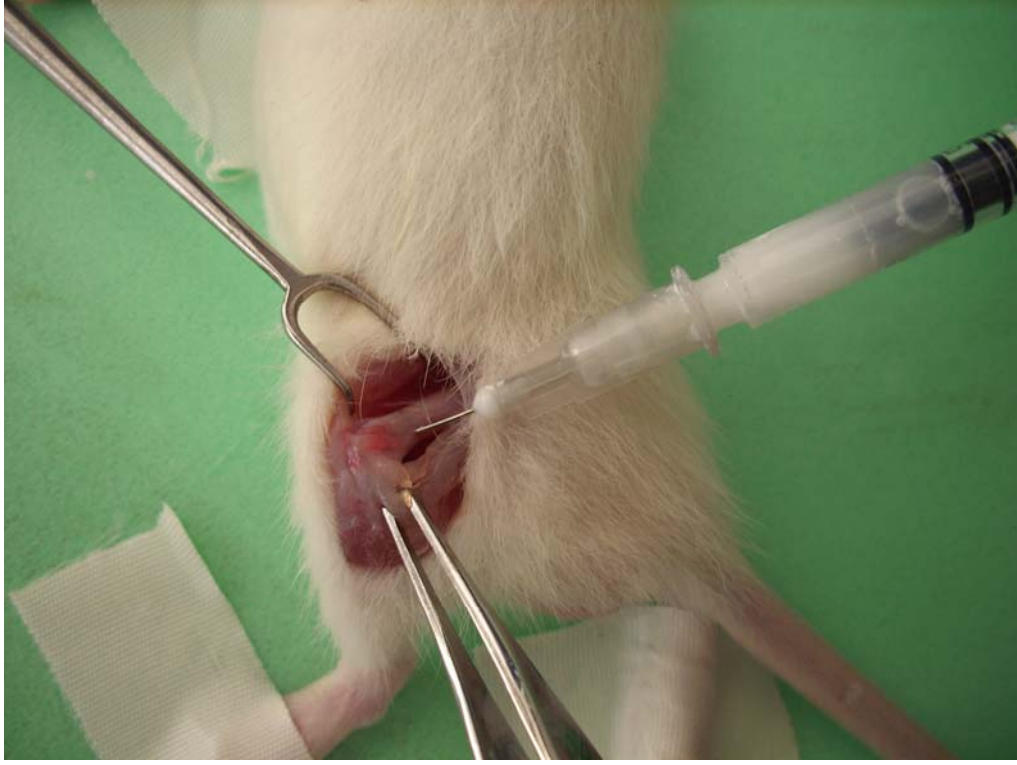
Makroskopik Ölçüm

Disseke edilen kemiklerin uzunluğu milimetrik kumpas kullanılarak ölçüldü. Femur uzunluğu, başın en üst noktasıyla medial kondilin en alt kenarı, tibia ise eminensiyanın en üst noktasıyla medial malleolün en alt noktası

referans alınarak ölçüldü. Kemiklerdeki makroskopik bulgular kaydedilerek, histoloji ekibine teslim edildi.



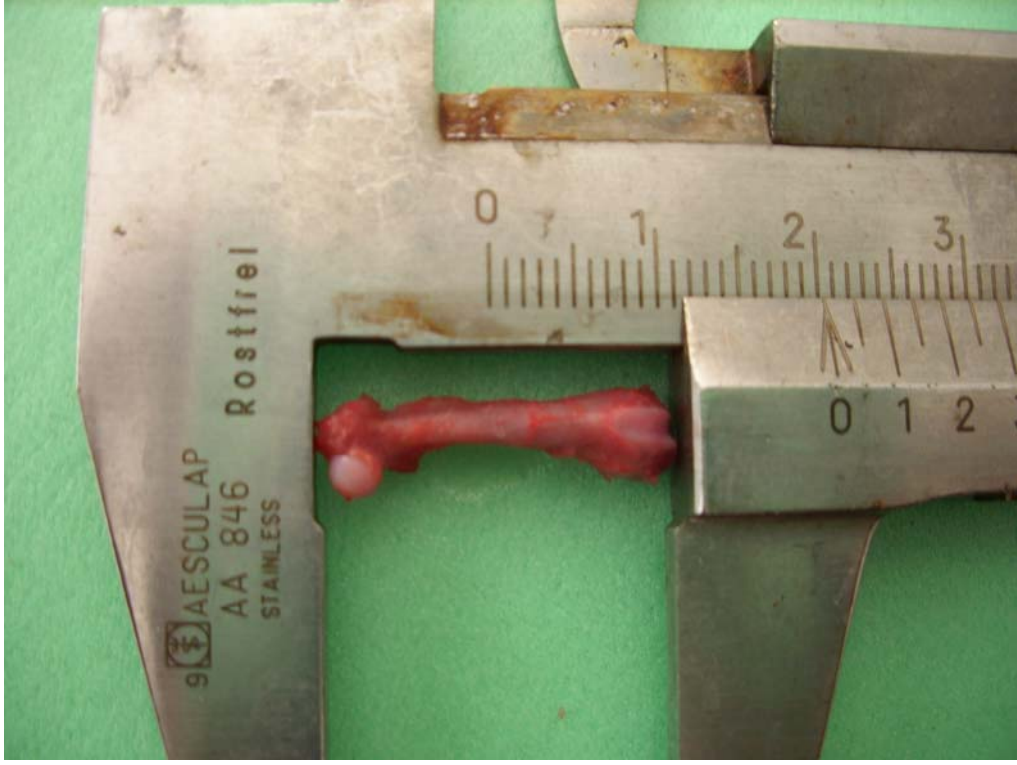
Resim 1; Femur distal metafizinin ortaya konması



Resim 2; Femur distal metafizine insülin enjektörü ile 0.2 cc distile suda çözülmüş atorvastatinin intraosseöz verilmesi



Resim 3; Yumuşak dokularından arındırılmış femur ve tibiannın makroskopik ölçümü.



Resim 4; Femurun ölçülmesi



Resim 5; Tibianın ölçülmesi

Biyokimyasal İşlemler

Elde edilen kalp kanı bekletilerek, pıhtı oluşumu sağlandı. Daha sonra 3.000 devirde 5 dk santrifuj edilerek, serum elde edildi. Serum örnekleri isimlendirilerek, ilgili çalışmalar yapılana kadar -20 derecede saklandı. Biyokimyasal tetkik yapılacağı sırada serumlar oda ısısında bekletilerek, eritildi ve tüm örneklerde osteoblastik aktivite göstergeleri olarak osteokalsin ve alkalen fosfataz, ve lipid profil göstergeleri (total kolesterol, trigliserid, HDL kolesterol) düzeylerine bakılarak kaydedildi. Osteokalsin düzeyleri kemilüminesans yöntemiyle sandviç prensibine dayanarak ölçülmüştür. Alkalen fosfataz, enzimatik kolorimetrik yöntem ile ölçüldü. Trigliserid ölçümünde, Gliserol fosfat oksidaz ve 4-aminofenozon ile olan enzimatik kolorimetrik metodu kullanıldı. Kolesterol ölçümünde, enzimatik, kolorimetrik metod (CHOD/PAP) kullanıldı. HDL-Kolesterol ölçümünde örnek ön hazırlığına gerek kalmadan yapılan enzimatik, kolorimetrik yöntem (CHOD/PAP) kullanıldı.

Histolojik İşlemler

Her deneğin sağ ve sol femur distali ve tibia'nın proksimalini içerecek şekilde diz eklemleri alındı ve %10'luk tamponlanmış formalin (pH:7.4) içinde 48 saat tespit edildi. Daha sonra yumuşak doku kısımları uzaklaştırıldı ve dekalsifikasyon işlemi için 0.1 M Tris-HCl tamponunda hazırlanmış %10 EDTA (pH:7.4) solüsyonuna alındı. Dekalsifikasyon solüsyonu günlük olarak değiştirildi. Dekalsifikasyonun tamamlandığı kalsiyum okzalat testiyle anlaşıldıktan sonra dokular 2 saat akarsuda yıkandı ve rutin olarak uygulanan doku takip yöntemi ile takip edildi.

Diz eklemi femur ve tibia olarak ayrıştırıldı. Femurların distal ve tibia'nın proksimal büyüme plağı kalınlıklarının mikroskopik ölçümü yapıldı. Ayrıca, femurların distal büyüme plağıyla tibia'nın proksimal büyüme plağı proliferatif bölgesinin hücre sayımları yapıldı. Kemiklerin büyüme plağı kalınlıklarının mikroskopik ölçümü için her kemikten eşit aralıklarla 10'ar kesit alındı. Her kesitte x200 büyütmede oküler mikrometreyle eşit aralıklı 5'er ölçüm yapıldı ve ortalamaları alındı. Femurların distal ve tibia'nın proksimal büyüme plağı proliferatif bölgesinin hücre sayımları için, her femurdan ve tibiadan eşit aralıklarla alınan üç ayrı kesitte üçer alanın (toplam 9 alan) x200'lük büyütmede mikroskopik görüntüsü elde edildi ve dijital fotoğrafı çekildi. Bu fotoğraflar

üzerinde dijital ortamda hücreler işaretlenerek sayıldı ve ortalamaları hesaplandı.

İstatiksel Analizler

İstatistiksel çalışmada, olgu ve gün gruplarının biyokimyasal parametreleri, femur ve tibiaların kesitlerinden alınan uzunluk, fizis kalınlığı ve hücre sayısı ölçümleri faktöriyel varyans analizi testi ile karşılaştırıldı. Grup içi sağ ve sol ekstremitelere ait değerlerin karşılaştırılması için eş yapma t- testi kullanıldı. İstatistiksel analiz için SPSS 11.5.1 for Windows ve STATISTICA 7.0 paket programları kullanıldı. Çalışmada 1. tip hata miktarı ($\alpha = 0,05$) olarak belirlendi.

BULGULAR

Deney sırasında anestezi etkisiyle Atorvastatin-1 grubundan ölen iki sıçan çalışma dışı bırakıldı. İntraosseöz ilaç enjeksiyonu sırasında kontrol grubundan da bir sıçanın sağ femurunda kırık olduğu için çalışma dışı bırakıldı. Takiplerde deneklerde yürüme problemi ve insizyon bölgesinde inflamasyon veya infeksiyon bulgusuna rastlanmadı.

Makroskopik Bulgular

Sakrifiye edilen deneklerin her iki femur ve tibiaları yumuşak dokulardan arındırılarak milimetrik kumpas ile makroskopik uzunlukları ölçüldü. Grup içi olası değişimin ölçülmesi için sağ ve sol ekstremitelere ait değerler ve farklı günlerin değerleri birbiriyle karşılaştırıldı. Bu karşılaştırmalardan hiç birinde anlamlı istatistiksel fark saptanmadı.

Gruplar arası değerlerin karşılaştırılması günler bazında yapıldı. Gruplar arasında anlamlı istatistiksel fark bulunmadı.

Grupların her iki taraf femur ve tibia kemiklerinin ölçüm sonuçlarının günlere göre ortalamaları Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2; Grupların sağ ve sol femur – tibia ölçümlerinin günlere göre cm cinsinden ölçümlerinin ortalama değerleri

	Sağ Femur	Sağ Tibia	Sol Femur	Sol Tibia
Sham				
12.gün (n=3)	2.03	2.73	2.16	2.73
24.gün (n=3)	2.46	2.96	2.26	3.1
36.gün (n=3)	2.46	2.86	2.46	2.93
Kontrol				
12.gün (n=4)	2.35	3	2.22	2.87
24.gün (n=4)	2.47	3.15	2.35	3.02
36.gün (n=4)	2.57	2.92	2.52	2.9
Atorvastatin-1				
12.gün (n=2)	2.55	3	2.5	2.8
24.gün (n=3)	2.43	3.13	2.43	3.16
36.gün (n=3)	2.66	3.26	2.7	3.23
Atorvastatin-2				
12.gün (n=3)	2.2	2.83	2.2	2.73
24.gün (n=3)	2	3.16	2.4	3.1
36.gün (n=4)	2.7	3.17	2.77	3.25

Biyokimyasal Bulgular

Sakrifiye edilen deneklerin kalp kanından elde edilen serumlarda atorvastatinin sistemik lipid düşürücü etkisini monitorize etmek üzere kolesterol, trigliserit ve HDL; osteoblastik aktivitedeki değişimi monitorize etmek için alkalen fosfataz ve osteokalsin çalışıldı. Grupların ortalama biyokimyasal değerleri Tablo 3'te verilmiştir.

İstatistiksel olarak gruplar arasında biyokimyasal göstergeler açısından anlamlı fark tespit edilmedi.

Tablo 3; Grupların serum biyokimyasal değerlerinin günlere göre ortalamaları

	Kolestrol (mg/dl)	Trigliserid (mg/dl)	HDL (mg/dl)	ALP (ü/litre)	Osteokalsin (ng/ml)
Sham					
12.gün(n=3)	70.33	106.45	0.23	384.26	62.96
24.gün(n=3)	65.39	22.44	9.37	191.64	48.08
36.gün(n=3)	67.64	89.35	4.95	300.86	39.37
Kontrol					
12.gün(n=4)	69.33	112.88	0.74	342.90	57.37
24.gün(n=4)	67.11	47.3	7.13	246.74	38.68
36.gün(n=4)	61.65	79.87	1.65	306.32	38.62
Atorvastatin-1					
12.gün(n=2)	67.88	61.22	52.57	298.27	42.4
24.gün(n=3)	83.21	31.06	9.1	267.17	50.6
36.gün(n=3)	54.43	81.46	8.43	253.93	32.35
Atorvastatin-2					
12.gün(n=3)	65.06	72.68	45.2	301	62.09
24.gün(n=3)	47.48	41.22	3.35	223.72	41.66
36.gün(n=4)	56.48	121.75	8.05	287.3	32.98

Histolojik Bulgular

Büyüme plağı kalınlığı açısından gruplar arasında, her gruptaki günler arasında ve sağ-sol değerlerin karşılaştırılmalarında anlamlı istatistiksel fark bulunamadı. Büyüme plağı kalınlığı ölçümlerinin ortalamaları Tablo 4'te verilmiştir.

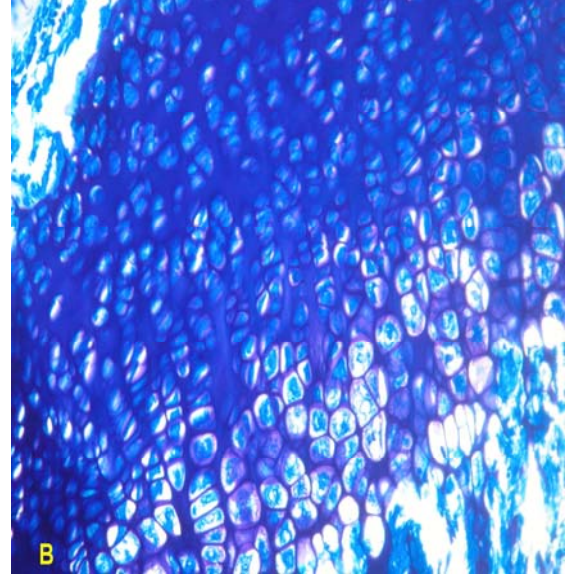
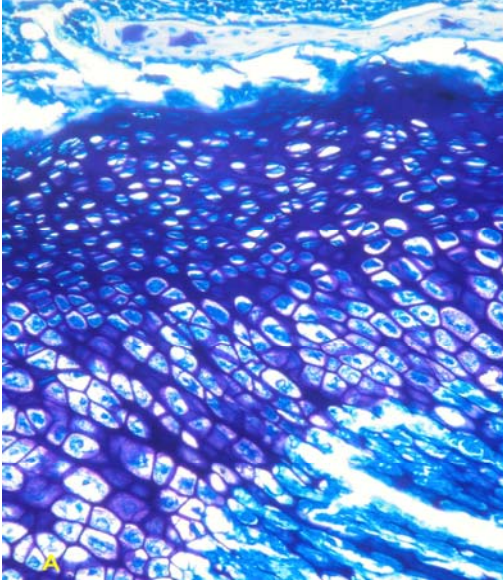
Tablo 4; Femur distal ve tibia proksimal büyüme plağı kalınlığının mikroskopik yöntemle ölçülen ortalamaları

	Sağ Femur (mikrometre)	Sol Femur (mikrometre)	Sağ Tibia (mikrometre)	Sol Tibia (mikrometre)
Sham				
12.gün(n=3)	51.1	56.7	55.76	56.7
24.gün(n=3)	21	26.8	23.1	20.56
36.gün(n=3)	40.86	34.8	37.95	32.4
Kontrol				
12.gün(n=4)	48.27	45.8	50.45	49.97
24.gün(n=4)	36.45	36.1	41.05	38.02
36.gün(n=4)	40.35	38.8	35.42	35.67
Atorvastatin-1				
12.gün(n=2)	48.95	51.3	45.45	50
24.gün(n=3)	38.76	38.8	44.23	38.23
36.gün(n=3)	33.9	28.5	28.95	30.73
Atorvastatin-2				
12.gün(n=3)	46.76	46.9	43.2	38.53
24.gün(n=3)	21.3	19.9	25.26	26.26
36.gün(n=4)	39.87	34.2	38.55	40.92

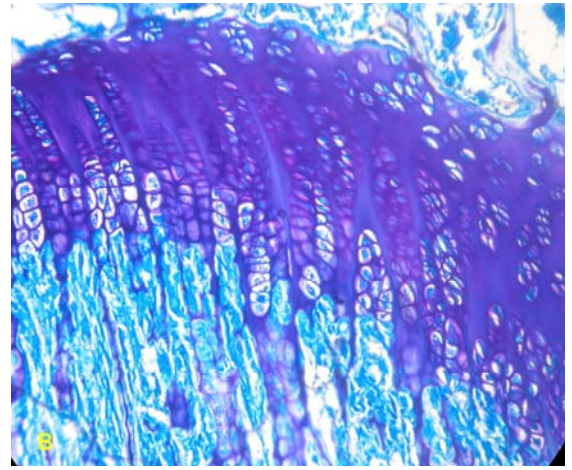
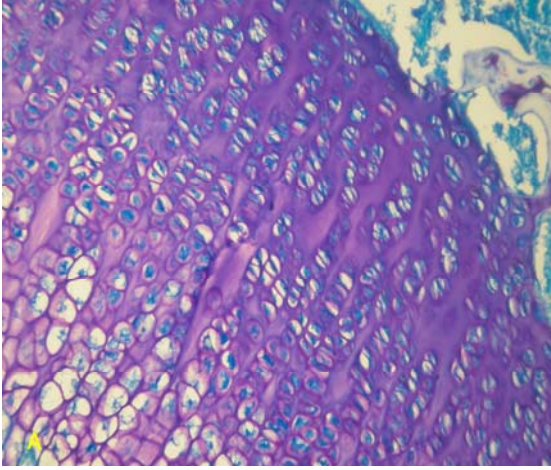
Femur distal ve tibia proksimal büyüme plakların proliferatif bölge hücre sayısı açısından gruplar arasında, her gruptaki günler arasında ve sağ-sol karşılaştırmaları açısından anlamlı istatistiksel fark bulunamadı. Ölçüm sonucu elde edilen bu değerlerin ortalamaları Tablo 5'te verilmektedir. Her gruptan birer deneğin femur distal ve tibia proksimal büyüme plaklarının mikroskopik görünümüleri Resim 6 – 13'te verilmektedir.

Tablo 5; Femur distal ve tibia proksimal büyüme plağı proliferatif bölgesinin x200 büyütmede mikroskobik alan başına düşen hücre sayımlarının ortalamasının gruplar arası dağılımı (hücre sayısı/mikroskobik alan)

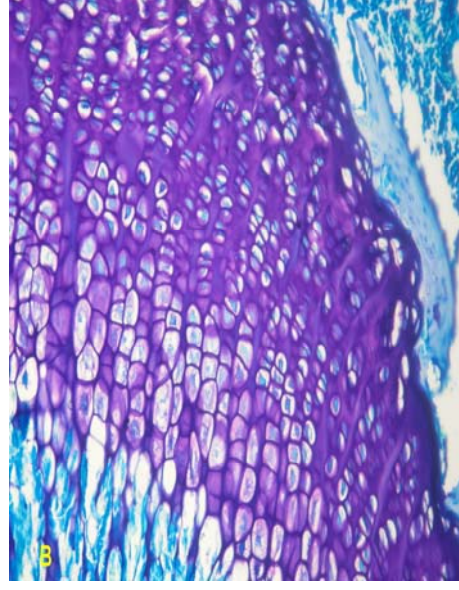
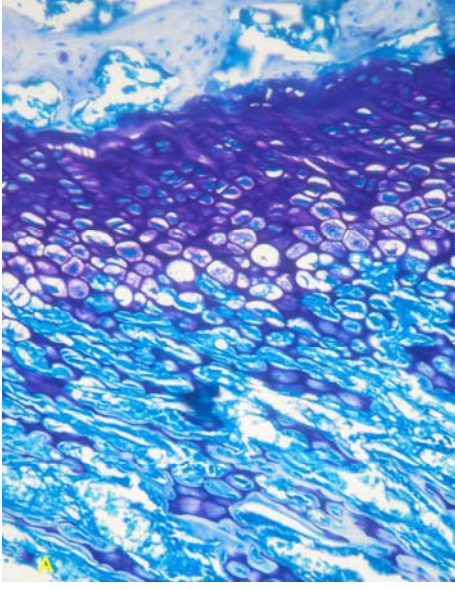
	Sağ Femur	Sol Femur	Sağ Tibia	Sol Tibia
Sham				
12.gün(n=3)	415.96	344.53	559.3	592
24.gün(n=3)	181.83	237.43	356.2	290.63
36.gün(n=3)	295.2	340.4	419.15	456.95
Kontrol				
12.gün(n=4)	338	368.37	480.7	433.8
24.gün(n=4)	320.52	276.9	419.6	411.7
36.gün(n=4)	318.2	325.72	425.47	436.72
Atorvastatin-1				
12.gün(n=2)	365.8	309.65	457.65	612.15
24.gün(n=3)	363.3	400.96	513.73	479.43
36.gün(n=3)	268.4	304.73	374.7	381.06
Atorvastatin-2				
12.gün (n=3)	273.1	388.96	451.2	445.06
24.gün (n=3)	200.4	212.63	318.63	256
36.gün (n=4)	290.9	252.72	385.8	346.5



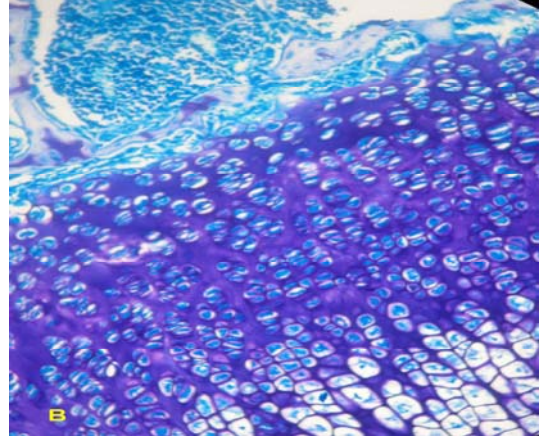
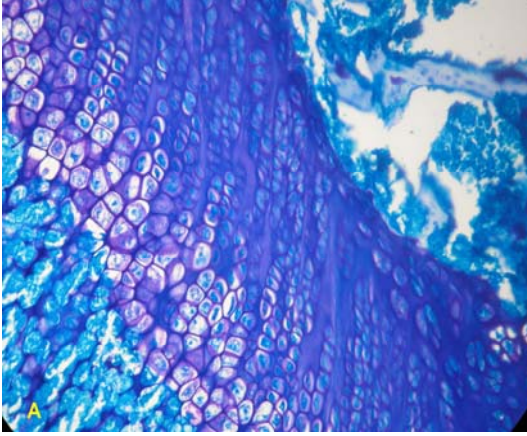
Resim 6; Grup 1 deki deneğin sağ femur(A) ve sol femur(B) distal büyüme plağının mikroskobik görünümü (toluidin mavisi, x200)



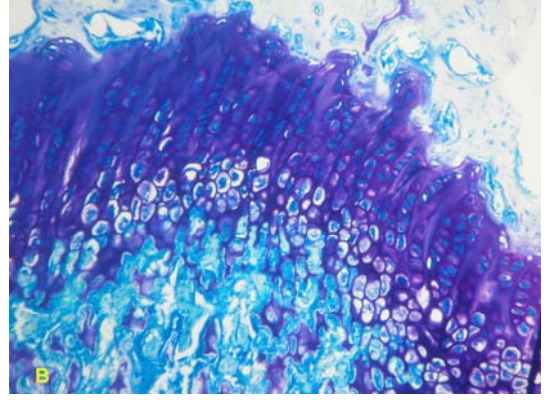
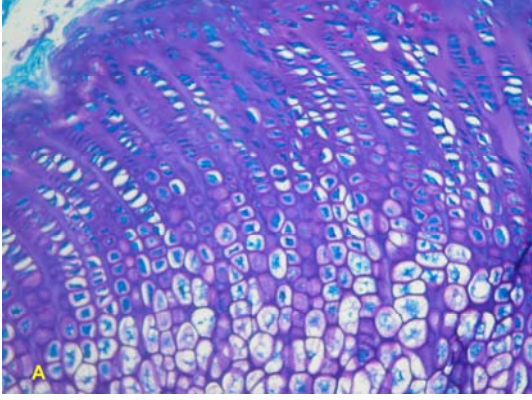
Resim 7; Grup 1 deki deneğin sağ tibia(A) ve sol tibia(B) proksimal büyüme plağının mikroskobik görünümü (toluidin mavisi, x200)



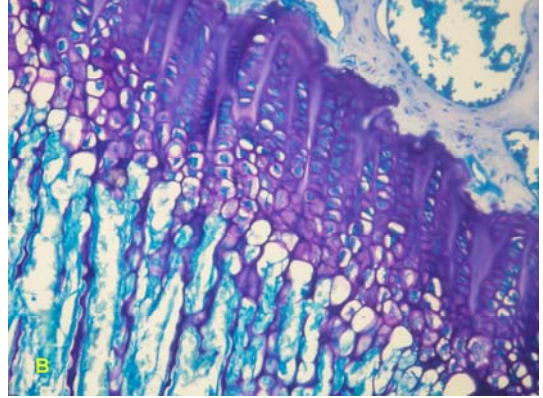
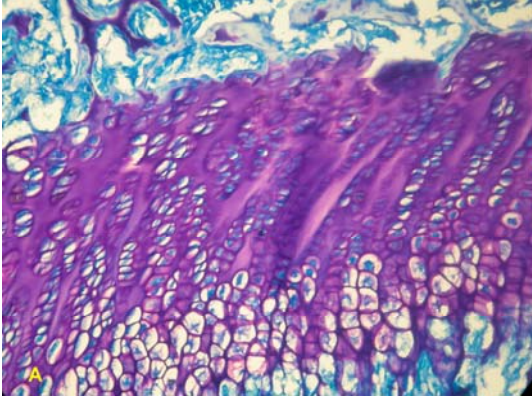
Resim 8; Grup 2 deki deneğin sağ femur(A) ve sol femur(B) distal büyüme plağının mikroskopik görünümü (toluidin mavisi, x200)



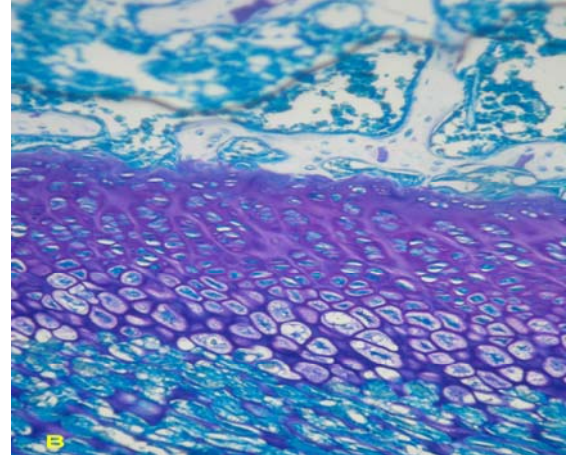
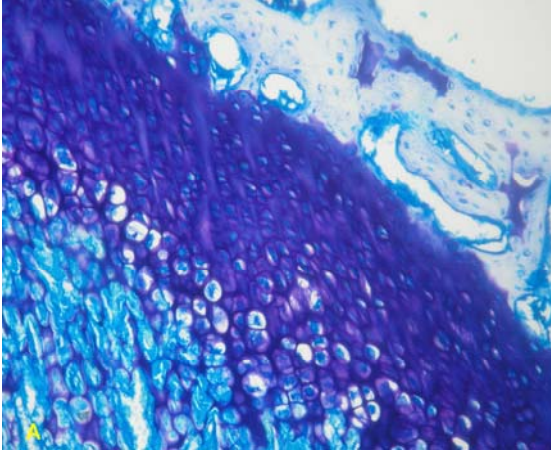
Resim 9; Grup 2 deki deneğin sağ tibia(A) ve sol tibia(B) proksimal büyüme plağının mikroskopik görünümü (toluidin mavisi, x200)



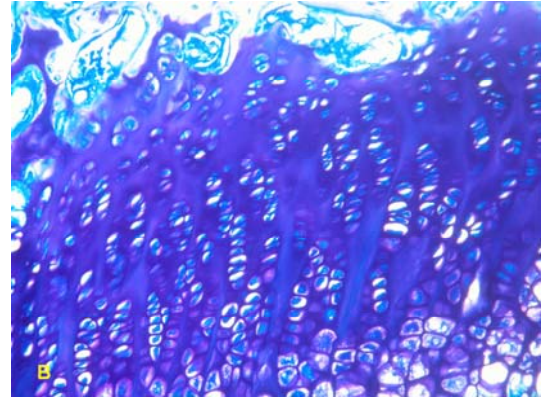
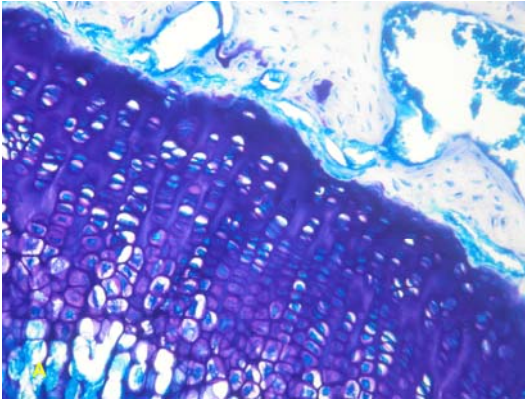
Resim 10; Grup 3 deki deneğin sağ femur(A) ve sol femur(B) distal büyüme plağının mikroskobik görünümü (toluidin mavisi, x200)



Resim 11; Grup 3 deki deneğin sağ tibia(A) ve sol tibia(B) proksimal büyüme plağının mikroskobik görünümü (toluidin mavisi, x200)



Resim 12; Grup 4 deki deneğin sağ femur(A) ve sol femur(B) distal büyüme plağının mikroskobik görünümü (toluidin mavisi, x200)



Resim 13; Grup 4 deki deneğin sağ tibia(A) ve sol tibia(B) proksimal büyüme plağının mikroskobik görünümü (toluidin mavisi, x200)

TARTIŞMA

Kemiklerin uzunlamasına büyümesi oldukça karmaşık ve henüz tam olarak aydınlatılmamış bir dizi olaylar zinciri sonrasında meydana gelir. İkincil kemikleşme merkezinin oluşmasıyla birlikte, büyüme plağı, uzun kemiklerin kırıldak yapıdaki uçlarında şekillenir. Uzunlamasına kemik büyümesi, ikincil kemikleşme merkezinde meydana gelen endokondral kemikleşme aracılığı ile olur^{1,14,16}. Büyüme plağında meydana gelen hasarlar sonucu, kemiğin uzunlamasına büyümesinde durma, dengesiz büyüme veya yavaşlama ortaya çıkar. Büyüme plağındaki bu hasar kalıtsal, doğumsal, travmatik, infeksiyöz gibi nedenlerle oluşur. Büyüme plağındaki hasar sonrası, etkilenen ekstremitelerde açısız deformiteler ve uzunluk farklılıkları ortaya çıkar. Bu problemler ortopedi disiplininin önemli uğraş alanlarından¹. Hastaların sosyal ve psikolojik durumlarını etkileyen ekstremitelerdeki bu deformiteler ve uzunluk farklılıklarını tedavi etmeye yönelik birçok girişim yapılmaktadır. Bu girişimler genellikle osteotomi ve distraksiyon osteogenezi gibi majör invazif girişimler olup morbiditeleri yüksektir. Günümüzde tıp alanındaki bilgi ve teknolojinin gelişmesi ile hastaya ve vücudunun etkilenmeyen kısımlarına mümkün olduğunca az zarar vererek invazif olmayan tedavi tekniklerine yönelim söz konusudur. Bu gelişmelerin bir kısmı hücrel ve moleküler düzeydeki girişimleri kapsamaktadır. Deneysel çalışmamızda, büyümesini tamamlamamış sıçanlarda sadece femur distal metafizine atorvastatin adlı farmakolojik ajan verilerek kemiğin uzunlamasına büyümesine etki oluşturmak amaçlandı. Varsayımımız intraosseöz uygulanan atorvastatin'in moleküler ve hücrel düzeyde aracı faktörler üzerinden, etki oluşturmasıydı.

Kırıldak yapıdaki büyüme plağı, kondrositlerin morfolojik durumu ve biyokimyasal olaylara göre temel olarak istirahat, proliferatif ve hipertrofik olmak üzere 3 histolojik bölgeye ayrılır^{1,14,60}. Kemiklerin uzunlamasına büyümesi bu histolojik zonların koordineli bir şekilde çalışması ile olur. Büyüme plağı zonları ve dolayısıyla kondrositler birçok sistemik ya da lokal faktörün etkisi altındadır. Kondrositler kendileri de salgıladıkları peptidler aracılığıyla otokrin ve parakrin etkiyle uzunlamasına büyümeyi ayarlarlar^{1,14}. Kemiklerin uzunlamasına büyümesini arttıran faktörlerin; kırıklar, osteotomiler, anabolik hormonlar ve büyüme faktörleri oldukları bildirilmektedir^{1,60,61,62}. Kırıklar ve osteotomiler, lokal faktörler aracılığıyla uzunlamasına büyümeyi arttırırlar^{60,61}. Statin grubu

hipolipidemik ilaçların kemik metabolizması üzerindeki etkilerini araştıran pek çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen⁸¹⁻⁹⁰, sistemik yolla verildiklerinde kemik dokudaki etkileri hakkında net bir kanı oluşmamış, lokal etkileri açısından bir çalışmaya rastlanmamaktadır.

Literatürde statinler üzerinde daha çok moleküler ve in vitro çalışmalar yapılmıştır. Statinler, kemikteki anabolik etkilerini birden fazla yol ile meydana getirirler. Bu etkilerin temelinde BMP-2 ve VEGF ekspresyonunun artışı ve osteoklast fonksiyonu ile sayısının baskılanmasının yer aldığı yönünde kanıtlar bulunmuştur^{55,56,82,83}. Statinlerin kemik metabolizması üzerindeki biyolojik etkisini ilk defa 1999'da Mundy ve ark.⁸⁸ bildirmişlerdir. Bu çalışmaya göre statinler in vitro ve in vivo ortamda kemik oluşumunu stimüle eder⁸⁸. Statinlerin BMP-2'nin aktivitesini arttırdığı birçok çalışmayla gösterilmiştir^{81-85,88-90}. Sugiyama ve ark.⁹¹ lipofilik statinler ile yaptıkları çalışmada, insan osteosarkom hücrelerinde BMP-2 mRNA ekspresyonunun arttığını, BMP-4 üzerinde herhangi bir etkinin olmadığı gösterilmiştir. Fakat hidrofilik statinlerde BMP-2 mRNA artışı olmamıştır. Phillips ve ark.⁹³ statinlerin BMP-2 ekspresyonunu stimüle ederek osteoblastik diferansiyasyonu arttırdığını göstermişlerdir. Simvastatin ve atorvastatin gibi lipofilik statinler VEGF ekspresyonunu da arttırmışlar^{81,82,90}. Lipofilik statinler, MC3T3-E1 osteoblast kültürlerinde VEGF mRNA ekspresyonu ve osteoblastik aktiviteyi arttırmışlar. Bu etkinin kanıtı kültür ortamındaki tip 1 kollagen ve ALP seviyelerindeki artış olarak sunulmuştur⁸¹. Osteoblast kültürlerinde ortama verilen statinler ayrıca, VEGF ekspresyonunu arttırmışlar⁸¹. Bu faktör kemik üzerinde otokrin ve/veya parakrin etki ile angiogenezi, kemikleşmeyi ve kemik döngüsünü arttırır^{94,95}. Maeda ve ark. da simvastatin ve atorvastatinin in vitro ortamda (MC3T3-E1 hücre kültürlerinde) VEGF, BMP-2, ALP, tip 1 kollagen ve osteokalsin gibi osteoblastik farklılaşma göstergelerini arttırdıklarını göstermişlerdir. Osteoblastik hücrelerdeki mineralizasyon esnasında VEGF-mRNA ekspresyonunun artmış olduğu gösterilmiştir⁸⁹. Literatürde, özellikle lipofilik statinlerin, in vitro ortamda moleküler düzeyde gösterdikleri anabolik etki hakkında yer alan bilgiler çalışmamızı planlamamıza yol açtı. Daha önce literatürde karşılaşmadığımız için statinlerin lokal in vivo etkinliğini araştırmak istedik. Statinlerin lokal büyüme faktörleri üzerinden etki yaparak, selektif tek kemikte uzunlamasına büyümeyi arttırabileceklerini düşündük.

Çalışmamızda, statinlerin kemik üzerindeki moleküler düzeyde anabolik etkisini gösterebilmek için büyümesi tamamlamamış kemiğe uygulanmasını uygun bulduk. Denek olarak 30 günlük sıçanlar seçildi. Sıçanların hayat dönemleri; ilk dört hafta hızlı büyüme, dördüncü-yedinci haftalar cinsel olgunluk kazanma ve 12. haftadan sonra tam erişkinlik dönemlerine ayrılır¹⁰³. Bu kemirgenin büyüme süreci, cinsel olgunlukla büyüme plağının kapanmaması dışında, insaninkine benzemektedir. İlk dört hafta olan hızlı büyüme dönemi çalışmamız için daha uygun olmasına rağmen, bu dönemdeki deneklerin anestezi ve cerrahi girişimi tolere edememelerini düşünerek 30 günlük sıçanları tercih ettik.

Atorvastatin, temelde lipid düşürücü etkisinden faydalanmak amacı ile kardiyovasküler hastalıklarda kullanılan bir ilaçtır. Atorvastatin lipofilik ve sentetik statinler grubundandır. Lipofilik statinler kolaylıkla hücre membranını geçerken hidrofilik statinler hücre membranını geçmek için özel taşıyıcıya ihtiyaç duyarlar⁸¹. Lipofilik statinlerin BMP-2 mRNA ekspresyonunu arttırarak osteogenez etki yaptıkları yönünde kanıtlar bulunmaktadır⁹¹. Hidrofilik statinlerin ise bu etkisi gösterilememiştir⁹¹. Atorvastatin aktif forma dönüşmek için metabolize olmaya gereksinim duymayan direk etkin ilaç formundadır. Atorvastatinin kemikteki direk etkinliği Maeda ve ark. tarafından in vitro çalışma ile gösterilmiştir⁸⁹. Bu yazarlar hücre kültüründe atorvastatinin osteoblastik farklılaşmayı arttırdığını göstermişlerdir⁸⁹. Biz, bu bilgiler ışığında, atorvastatinin saf formunun intraosseöz etkin olabileceğini düşünerek iki ayrı dozda uygulamayı uygun gördük. Olası sonuçların değerlendirilebilmesi için sham ve eşit hacim distile su enjeksiyonu yapılan kontrol grupları oluşturduk.

Çalışmamızda atorvastatin'in olası sistemik etkisini göstermek için deneklerin serumlarında lipid düzeylerine bakmayı planladık. Statinler kolesterol sentez yolunda yer alan hidroksi-metil glutaril-koenzim-A (HMG-KoA) redüktazın inhibitörleridir^{81,82}. Klinik olarak statinler, serum total kolesterolü, LDL ve trigliserid seviyelerinde azalmaya yol açarlar. Biz farklı gruplarımız arasında atorvastatin'in bu sistemik etkisi açısından bir farklılık saptamadık. Bu yönüyle tek doz uygulamanın yeterli sistemik etkinlik oluşturmayabileceği, ya da intraosseöz atorvastatin, uzun sürede etki yapmasına rağmen, dozun yetersiz kalmış olabileceğini düşündük.

Literatürde moleküler düzeyde yapılan çalışmalarda statinlerin osteoblastik aktivite göstergeleri olan ALP ve osteokalsin düzeylerini arttırdığı bildirilmiştir^{89,105}. Biz bu etkinin sistemik göstergeleri olması için denek serumlarında osteokalsin ve alkalen fosfataz seviyelerini çalıştık. Sonuçlarımıza göre bu göstergeler açısından gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Bu sonuç histolojik bulgularımızla korele idi.

Statinler üzerinde in vivo ortamda yapılan çalışma nadirdir. Oxlund ve ark. sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada oral olarak verilen lipofilik gruptaki Simvastatin sonrasında vücut ağırlığı, femur kemik uzunluğu, kansellöz kemik volümü ve kortikal kemik volümünü ölçmüşlerdir. Bu yazarlar, vücut ağırlığı, femur kemik uzunluğu ve kortikal kemik volümü açısından anlamlı bir değişim bulamamışlardır. Kansellöz kemik volümü yapısında ise plasebo grubu ile karşılaştırıldığında %23'lük bir artış, kemiğin kompresif kuvvetlere direnci açısından ise %24'lük bir artış bildirmektedirler¹⁰⁰. Wong ve ark. tavşanlarda oluşturdukları kafatası defektlerinde statinlerin osteoindüktif etkisini araştırmışlardır. Kollagen matriks taşıyıcıya statin ekledikleri grupta sadece kollagen matriks yerleştirilen gruba göre kemik defektinde %308 daha fazla yeni kemik oluşumu saptamışlardır¹⁰¹. Daha önce çalışmamıza benzer şekilde intraosseöz uygulamalar yapılmıştır. Lokal olarak büyüme plağı içine uygulanan GH'nun uzunlamasına kemik büyümesini arttırdığı görülmüştür⁷⁹. Baron ve ark.⁷² büyüme plağının metafizyal sınırına FGF-2 infüzyonu yaparak bu bölgede vasküler invazyonun ve kemikleşmenin arttığını göstermişlerdir. Biz çalışmamızda Baron ve ark. tekniğine benzer olarak femur distal fizisine komşu metafize intraosseöz atorvastatin uyguladık. Olası kemiksel değişimleri araştırmak için hem femur hem de tibia kemiklerini çalışmaya dahil ettik. Bu yöntem ile, ve ayrıca karşı ekstremitte kemikleri ile karşılaştırarak, olası lokal selektif değişimin daha iyi gösterilebileceğini düşündük.

Literatürde statinlerin kondrosit sayısını arttırdıkları bildirilmektedir. Statinler in vitro ortamda BMP-2 ve VEGF'yi arttırarak bu etkiye yol açtıkları kanıtlanmıştır^{81,82,85}. Bu kanı, Leem ve arkadaşlarının sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışma ile kuvvetlendirilmiştir¹⁰². Bu yazarlar, üç haftalık sıçanlara 6 gün süreyle 5 mg/kg/gün intraperitoneal lovastatin uygulayarak, tibia proksimal fizisinde BMP-2 düzeyi ve kondrosit sayısında artış saptamışlardır¹⁰². Biz benzer ancak lokal bir etki oluşturmak için uyguladığımız yöntem sonrası

büyüme plağında kalınlık artışı ve proliferasyon katmanı kondrosit sayısını değerlendirdik. Her iki taraf femur ve tibia büyüme plaklarının değerlendirildiği çalışmamızın sonuçlarına göre çalışma grupları ile kontrol ve sham grupları arasında büyüme plağı kalınlığı ve hücre sayısı açısından anlamlı bir fark saptamadık. Bu farkın oluşmamasının olası nedenleri arasında atorvastatinin lokal etki oluşturmaması, etki oluşturabilirse verdiğimiz her iki dozun yetersiz oluşları, atorvastatinin kemik içinden hızlı emilerek uzun süreli etki oluşturmaması veya istatistiksel fark oluşması için olgu sayısının azlığı sayılabilir.

Bu çalışmanın ana kısıtlılıkları denek sayısının istatistiksel çalışma için azlığı, mikroskopik çalışmaya alınan büyüme plağı bölgesinin standardize edilememesi ve atorvastatin doz ayarlama sorunlarıdır. Standardize edilemeyen büyüme plağı bölgeleri birbirinden farklı ölçümler ve hücre sayımlarına yol açar. Biz bu kısıtlılığı randomize çoklu kesit almakla aşmaya çalıştık. Literatürde in vitro ortamda yapılan çalışmalarda lipofilik statinlerin etkisinin doz bağımlı olduğu saptanmıştır⁸¹. Çalışmamıza benzer bir uygulama bulunmadığı için biz atorvastatini iki ayrı dozda uyguladık. Doz ayarlamasını yaparken, kg başına etkin dozun çok üstünde olmasına dikkat ettik. Diğer taraftan olgunlaşmamış sıçanın kemik içi enjeksiyona izin veren hacmi (maksimum 0.2 cc) ve bu hacimde çözülebilen atorvastatin miktarı da doz kararımızda göz önünde bulundurmamız gereken etkenlerdi. Enjekte edilebilen hacim ve bu hacimde çözülebilen atorvastatin miktarını ön çalışmalarla belirleyerek bu konudaki kısıtlılığı minimuma getirmeye çalıştık. Buna rağmen etkin, tek lokal doza ulaşmamış olabiliriz. Sonuçlarımızın anlamlı olmamasında etkin olabilecek diğer bir husus uyguladığımız dozun yeterli süreklilikte etkin olmaması durumudur.

Kemiğin selektif uzunlamasına büyümesini etkilemek kas-iskelet sorunları açısından önemli ufuklar açan bir gelişme olacaktır. Bu yönde moleküler, hücresel, mekanik⁶⁰ ve bunların karmasından oluşan yöntemler üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Çalışmamız bu çerçevede içerisinde ele alınabilen deneysel bir araştırmadır. Bu çalışmadan edindiğimiz deneyimlerle ve kemiğin uzunlamasına büyümesinin zamansal olarak uzun süreli bir süreç olmasından dolayı ileride planlanacak çalışmaların uzun süreli uyaran sağlayacak şekilde planlanması gerektiği kanısındayız. Çalışmamızdaki gibi moleküler düzeyde bir ajanın etkinliği araştırılacaksa etkin doz ve yavaş salınım

olanakları sağlanmalıdır. Örneğin biz bu çalışmada kullandığımız atorvastatini, lokal ilaç salınımı yapan bir sisteme yükleyerek lokal etkinliğini araştırabiliriz. Kuşkusuz böyle bir çalışmanın temel şartı in vivo'dan önce in vitro deneylerle lineer ve yeterli ilaç salınımını bulmaktır. Çalışmamızda yapıldığı gibi kullanılacak olan ajanların lokal etkilerinin yanı sıra sistemik etkilerinin göstergelerini de göz önünde bulundurarak plan yapılmalıdır.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Literatürde benzeri bulunmayan in vivo çalışmamızda atorvastatinin lokal uygulaması ile kemiğin uzunlamasına büyümesi üzerindeki etkileri araştırıldı. Sonuçlarımıza göre tek lokal intraosseöz saf atorvastatin doz uygulaması ile;

— Denek serumlarında sistemik lipolitik etkinin göstergeleri olan kolesterol ve trigliserit değerlerinde anlamlı değişiklik saptanmamıştır,

— Serumda osteoblastik aktivite göstergeleri olan alkalen fosfataz ve osteokalsin değerlerinde anlamlı değişiklik saptanmamıştır,

— Makroskopik olarak ölçülen kemiklerin uzunluklarında anlamlı değişiklik saptanmamıştır,

— Histolojik çalışmada değerlendirilen büyüme plağı kalınlığı ve proliferatif bölge kondrosit sayısında anlamlı değişiklik saptanmamıştır.

Çalışma grupları arasında anlamlı istatistiksel farklılığın bulunmaması; atorvastatin doz yetersizliği, etkinin sürekliliğinin sağlanamaması ve yetersiz denek sayısına bağlı olabileceği düşünüldü.

Sonuç olarak tek intraosseöz atorvastatin uygulamasının, kemiğin uzunlamasına büyümesinde etki yaptığı yönünde bir kanıt elde edilememiştir.

Olgunluğa ulaşmamış kemiğin uzunlamasına büyümesine lokal selektif etki oluşturabilmek için deneysel çalışmalar devam etmektedir. Burada sunulan çalışma bu çerçevede içerisinde yer almaktadır. Bu deneyimlerin sonuçları, ekstremitelerin açısal deformiteleri ve uzunluk farklarının tedavisi gibi klinik sorunlara yönelik gelecekteki çalışmalara ışık tutar.

KAYNAKLAR

1. Ianotti JP, Goldstein S, Kuhn J, Lipiello L, Kaplan FS, Zaleske DJ. The formation and growth of skeletal tissues. In: Buckwalter JA, Einhorn TA, Simon SR, editors. Orthopaedic basic science, Biology and Biomechanics of the Musculoskeletal System. 2nd ed. Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons 2000;78-105.
2. Sadler TW.Langman Medikal Embriyoloji. Çeviri; Prof.Dr. Başaklar A.(eds) Can. 9. Baskı, Ankara: Palme 2005;167-91.
3. Hall BK, Miyake T. All For One and One For All: Condensations and initiation of skeletal development. Bioessays 2000;22:138-47.
4. Horton WA. Skeletal Development: Insights From Targeting The Mouse Genome. The Lancet 2003;362:560-69.
5. Moore, persound. Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi. In: Çeviri; Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H. (eds) 6. Baskıdan Çeviri, İstanbul, Nobel 2002;406-24.
6. Larsen WJ. Human Embryology. 2nd ed. New York: Livingstone Churchill 1997;311-44
7. Peteres H, Wilm B, Sakai N, Imai K, Maas R, Balling R. Pax1 and pax9 synergistically regulate vertebral column development. Development 1999;126:5399-5408.
8. DeLise AM, Fischer L, Tuan RS. Cellular interactions and signaling in cartilage development. Osteoarthritis Cartilage 2000;8:309-34.
9. Fawcett DW. Bloom and Fawcett, A Textbook of Histology. 12th ed. New York: Chapman-Hall 1994;199-229.
10. Ross MH, Gordon IK, Pawlina W. Histology a Text and Atlas. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams-wilkins 2003;180-213.
11. Erkoçak A. Genel Histoloji. 3. Baskı. Ankara, Ankara Üniversitesi Basımevi 1980;236-44.
12. Leeson TSS, Leeson CR, Paparo AA. Text/atlas of histology. Philadelphia: W.b. Saunders 1988;168-89.
13. Stevens A, Lowe J. Human Histology. 2nd ed. Philadelphia: Mosby 1997;234-47.

14. Lydia Didt-Koziel, Manuela Wuelling ve Andrea Vortkamp Kondrogenez ve Osteogenezde Büyüme Faktörlerinin Rolü. *Current Opinion in Orthopaedics Türkçe Baskı* 2006;4:198-206.
15. Portner GA, Gurley AM, Roth SI. Bone. In: Stenberg SS eds. *Histology for Pathologist*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-roven publishers 1997;85-106.
16. Karsenty G, Wagner EF, Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Development Cell* 2002;2:309-406.
17. Ducky P. Cbfa1: A molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn* 2000;219:461-71.
18. Olsen BR, Reginato AM, Wang W. Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000;16:191-220.
19. Schipani E, Ryan HE, Didrickson S, Kobayashi T, Knight M, Johnson RS. Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev* 2001;15:2865-76.
20. Esing MT, Chen QJ, Vu TH, et al. Matrix metalloproteinase 9 and vasküler endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. *J Cell Biol* 2000;151:879-90.
21. Lee ER, Lamplugh L, Davoli MA. Enzymes active in the areas undergoing cartilage resorption during the development of the secondary ossification center in the tibiae of rats ages 0-21 days: Two groups of proteinases cleave the core protein of aggrecan. *Dev Dyn* 2001;222: 52-70.
22. Costales L, Alvarez J, Balbin M, Lopez JM. Cell proliferation during secondary ossification of rat tibia. *European Cell and Materials* 2002;4:47.
23. Gartner LP, Hiatt JL. *Color Textbook of Histology*. 2nd ed. Philadelphia, W. B. Saunders Company 2001;135-54.
24. Ballock RT, O'Keefe RJ. The biology of the growth plate. *J Bone Joint Surgery* 2003;85:715-26.
25. de Crombrughe B, Lefebvre V, Behringer RR, BI W, Murakami S, Huang W. Transcriptional mechanism of chondrocyte differentiation. *Matrix Biol.* 2000;19:389-94.
26. Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 1996;273:613-22.

27. Sera R, Karaplis A, Sohn p. Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP)-dependent and independent effects of transforming growth factor beta on endochondral bone formation. *J Cell Biol* 1999;145:783-94.
28. Ballock RT, Heydemann A, Wakefield LM, Flanders KC, Roberts AB, Sporn Mb. TGF-B 1 prevents hypertrophy of epiphyseal chondrocytes: regulation of gene expression for cartilage matrix proteins and metalloproteases. *Dev Biol* 1993;158:414-29.
29. Ferguson CM, Schwarz EM, Reynolds PR, Puzas JE, Rosker RN, o!Keefe RJ. Smad2 and smad3 mediate transforming growth factor-beta1-induced inhibition of chondrocyte maturation. *Endocrinology* 2000;141:4728-35.
30. Pedrozo HA, Schwartz Z, Gomez R, Ornoy A, Xin-Sheng M, Dallas SL, Bone-wald LF, dean DD, Boyan BD. Growth plate chondrocytes store latent transforming growth factor (TGF)-beta 1 in their matrix through latent TGF-beta 1 binding protein-1. *J cell Physiol* 1998;177:343-54.
31. Hunziker EB. Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes. *Microsc Res Tech* 1994;28:505-19.
32. Farnum CE, Wilsman NJ. Converting a differentiation cascade into longitudinal growth: stereology any analysis of transgenic animals as tools for understanding growth plate function. *Curr Opin Orthop* 2001;12:428-33.
33. Eerola I, elima K, Markkula M, Kananen K, Vuorio E. Tissue distribution and phenotypic consequences of different type X collagen gene constructs in transgenic mice. *Ann N Y Acad Sci* 1996;785:248-50.
34. O'Keefe RJ, Loveys LS, Hicks DG, Reynolds PR, Crabb ID, Puzas JE Rosler RN. Differential regulation of type-2 and type-X collagen synthesis by paratiroid hormone-related protein in chick growth-plate chondrocytes. *J Orthop Res* 1997;15:162-74.
35. Anderson HC. Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Orthop* 1995;314:266-80.
36. Volk SW, Leboy PS. Regulating the regulators of chondrocyte hypertrophy. *J Bone Miner Res* 1999;14:483-6.
37. Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, Mukudal Y, Kawayami Y, Nohno T, Higuchi Y, takemito S, Ohuchi H, Noji S, Kurisu K. Bone morfhogenic protein signaling is required for maintenance of differentiated phenotype,

- control of proliferation, and hypertrophy in chondrocytes. *J Cell Biol* 1998;140:409-18.
38. Grimsurd CD, Romano PR, D'Souza M, Puzas JE, Schwarz EM, Reynolds PR, Rosler RN, O'Keefe RJ. BMP signaling stimulates chondrocyte maturation and the expression of indian hedgehog. *J Orthop Res* 2001;19:18-25.
 39. Zhand D, Ferguson CM, O'keefe RJ, Puzas JE, Rosler RN, Reynolds PR. A role for the BMP antagonist chordin in endochondral ossification. *J Bone Miner Res* 2002;17:293-300.
 40. Kim IS, Otto F, Zabel B, Mundlos S. Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa-1. *Mech Dev* 1999;80:159-70.
 41. Leboy P, Grasso-Knight G, D'Angelo m, VolkSw, lian JV, drissi H, Stein GS, adams SL. Smad-runx interactions during chondrocyte maturation. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83 Suppl 1 (Pt 1):S15-22.
 42. Johnstone EW, Leane PB, Kolesik P, Byers S, Foster BK. Spatial arrangement of physeal cartilage chondrocytes and the structure of the primary spongiosa. *J Orthop Sci* 2000;5:294-301.
 43. Kirsch T, Nah HA, Shapiro IM, Pacifici M. Regulated production of mineralization-compentent matrix vesicles in hypertrophic chondrocytes. *J cell Biol* 1997;137:1149-60.
 44. Kirsch t, Harrison G, Golub EE, Nah HD. The roles of annexins and types 2 ve 10 collagen in matrix vesicle-mediated mineralization of growth plate cartilage. *J Biol Chem* 2000;275:35577-83.
 45. Boyan BD, Sylvia VL, Dean DD, pedrozo H, del Toro F, Memere I, Posner GH, schwarz Z. 1,25-(OH)₂D₃ modulates growth plate chondrocytes via membrane receptor-mediated protein kinase C by a machanism that involves changes in phospholipid metabolism and the action of arachidonic acid and PGE₂. *Steroids* 1999;64:129-36.
 46. Mwale F, Tchetina E, Wu CW, Poole AR. The assembly and remodeling of the extracellular matrix in the growth plate in relationship to mineral deposition and cellular hypertrophy: an in situ study of collagens 2 and 9 and proteoglycan. *J Bone Miner Res* 2002;17:275-83.

47. D'Angelo M, yan Z, Nooreyazdan M, Pacifici M, Sarment DS, Billings PC, Leboy PS. MMP-13 is induced during chondrocyte hypertrophy. *J Cell Biochem.* 2000;77:678-93.
48. D'Angelo M, Billings PC, Pacifici M, Leboy PS, Kirsch T. Authentic matrix vesicles contain active metalloproteases(MMP). A role for matrix vesicle-associated MMP-13 in activation of transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 2001;276:11347-53.
49. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88:355-65.
50. Shapiro IM, hatori M, Rajpurohit R, klatte KJ, teixeira CC. Studies of fragmented DNA in the avian growth plate. Evidence of apoptosis in terminally differentiated chondrocytes. *J Bone Miner Res* 1995;10(SI):S351.
51. Roach HI, baker JE, clarke NM. Initiation of the bony epiphysis in long bones. Chronology of interactions between the vascular system and the chondrocytes. *J Bone Miner Res* 1998;13:950-61.
52. Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 1997;91:443-6.
53. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281:1322-6.
54. Skawina A, Litwin JA, Gorczyca J, Miodonski AJ. The vascular system of human fetal long bones: a scanning electron microscope study of corrosion casts. *J Anat* 1994;185:369-75.
55. Carlevaro MF, Cermelli S, Cancedda R, Descaizi Cancedda F. Vascular Endothelial growth factor(VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation. Auto-paracrine role during endochondral bone formation. *J Cell Sci* 2000;113:59-69.
56. Garcia-Ramirez M, Toran N, Andaluz P, carrascosa A, Audi L. Vascular Endothelial growth factor is expressed in human fetal growth cartilage. *J Bone Miner Res* 2000;15:534-40.
57. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowaiski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 1999;5:623-8.

58. Weise M, De-Levi S, Barnes KM, Gafni RI, Abad V, Baron J. Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Proc natl Acad Sci USA* 2001;98:6871-6.
59. Bilezikian JP, Morishima A, Bell J, Grumbach M. Increased bone mass as a result of estrogen therapy in a man with aromatase deficiency. *N Engl J Med* 1998;339:599-603.
60. Eskandari MM, Ballı E, Ayan İ, Aktaş S, Yılmaz C. The effect of repeated metaphyso-diaphyseal perforations on the growth plate and articular cartilage of the growing rat femur. *Joint Dis Rel Surg* 2006;17(1):38-43.
61. Garces GL, Garcia-Castellano JM, Nogales J. Longitudinal overgrowth of bone after osteotomy in young rats: influence of bone stability. *Calcif Tissue Int* 1997;60:391-3.
62. Nilsson O, Marino R, De Luca F, Phillip M. Endocrine Regulation of the Growth Plate. *Horm Res* 2005;64:157-65.
63. Khan SN, Bostrom MPG, Jane JM. Bone growth factors. *The Orthopedic Clinics of North America*. Philadelphia, W.B. Saunders Company 2000;31:375-87.
64. Camacho-Hubner C, Savage M. Insulin-like growth factor 1 deficiency. *Horm Res* 2001;55:17-20.
65. Dupont J, Holzenberger M. Biology of Insulin –like growth factors in development. *Birth Defects Research* 2003;69:257-71.
66. Canalis E, Centrella M, Burch W, McCarthy T. Igf-1 mediates selective anabolic effects of parathyroid hormone in bone cultures. *J Clin Invest* 1989;83:60-65.
67. Chihara K, Sugimoto T. The Action of GH/IGF-1/IGFBP in osteoblasts and osteoclasts. *Horm Res* 1997;48:45-49.
68. Hock JM, Centrella M, Canalis E. Insulin-like growth factor 1 has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology* 1988;122:254-60.
69. Doschak MR, Cooper DML, Huculak CN, et al. Angiogenesis in the distal femoral chondroepiphysis of the rabbit during development of the secondary centre of ossification. *J Anat* 2003;203:223-33.

70. DeBias F, Hott M, Graulet AM, Marie PJ. The effects of fibroblast growth factor-2 on human neonatal calvaria osteoblastic cells are differentiation stage specific. *J Bone Miner Res* 1998;13:645-54.
71. Mancilla EE, Luca FD, Uyeda JA, Czerwiec FS, Baron J. Effects of fibroblast growth factor-2 on longitudinal bone growth. *Endocrinology* 1998;139(6):2900-04.
72. Baron J, Klein KO, Yanovski JA, Novosad JA, Bacher JD, Bolander ME, Cutler GB. Induction of growth plate cartilage ossification by basic fibroblast growth factor. *Endocrinology* 1994;135:2790-93.
73. Shi Y, Massagne J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003;113:685-700.
74. Kingsley DM. The TGF-beta superfamily: New members, new receptors, and new genetic test of function in different organisms. *Genes & Dev* 1994;8:133-46.
75. Critchlow MA, Bland YS, Ashhurst DE. The effects of age on the response of rabbit periosteal osteoprogenitor cells to exogenous transforming growth factor-beta2. *Journal of Cell Science* 1994 Feb;107 (Pt 2):499-516.
76. Ebisawa T, Tada k, Kitajima I, Tojo K, Sampath TK, Kawabata M, Miyazono K, Imamura T. Characterization of bone morphogenetic protein-6 signaling pathways in osteoblast differentiation. *Journal of Bone Science* 1999;112:3519-3527.
77. Kloen p, Doty SB, Gordon E, Rubel IF, Goumans MJ, Helfet DL. Expression and Activation of the BMP_Signaling Components in Human Fracture Nonunions. *J Bone Joint Surg. Am* 2002;84:1909-1918.
78. Nilsson O, Marino R, Luca FD, Phillip M. Endocrine regulation of the growth plate. *Horm Res* 2005;64:157-165.
79. Isaksson OG, Jansson JO, Gause IA. Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. *Science* 1982;216:1237-1239.
80. Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, Fisher C, Qin K. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *Clin Endocrinol Metab* 1995;80:3689-3698.
81. Maeda T, Kawane T, Horiuchi N. Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. *Endocrinology* 2003;144:681-692.

82. Horiuchi N, Maeda T. Statins and bone metabolism. *Oral Diseases* 2006;12:85-101.
83. Bauer DC. HMG CoA reductase inhibitors and the skeleton. A comprehensive review. *Osteoporos* 2003;14:273-282.
84. LaRosa JC, He J, Vupputuri S. Effect of statins on risk of coronary disease. A meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 1999;282: 2340-2346.
85. Garrett IR, Mundy GR. The role of statins as potential targets for bone formation. *Arthritis Res* 2002;4:237-240.
86. Huang PL, Huang Z, Mashimo et al. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 1995;377:239-242.
87. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks F, Braunwald E. Long term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. The cholesterol and recurrent events (CARE) investigators. *Circulation* 1999;100:230-235.
88. Mundy G, Garrett R, Harris S et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* 1999;286:1946-1949.
89. Maeda T, Matsunuma A, Kurahashi I, Yanagawa T, Yoshida H, Horiuchi N. Induction of osteoblast differentiation indices by statins in MC3T3-E1 cells. *J Cell Biochem* 2004;92:458-471.
90. Edwards CJ, Spector TD. Statins as modulators of bone formation. *Arthritis Res* 2002;4:151-153.
91. Sugiyama M, Kodama T, Konishi k, Abe k, Asami S, Okawa S. Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein-2 in human osteosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 271:688-692.
92. Maritz FJ, Conradie MM, Hulley PA, Gopal R, Hough S. Effect of statins on bone mineral density and bone histomorphometry in rodents. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol* 2001;21:1636-1641.
93. Phillips BW, Belmonte N, Vernochet C, Ailhaud G, Dani C. Compactin enhances osteogenesis in murine embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;284:478-484.

94. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 1999;5:623-628.
95. Deckers MM, Karperien M, Van Der Bent C, Yamashita T, Papapoulos SE, Lowik CW. Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology* 2000;141:1667-1674.
96. Treloar V. Bisphosphonates and osteoporosis. *N Engl J Med* 2002;346:2088-2089.
97. Harada H, Tagashira S, Fujiwara M et al. Cbfa 1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 1999;274:6972-6978.
98. Song C, Guo Z, Ma q et al. Sivastatin induces osteoblastic differetiation and inhibits adipocytic differentiation in Mouse bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res commun.* 2003;398:458-462.
99. Chan KA, Andrade SE, Boles M. et al. Inhibitors of hydroxymethhylglutaryl-coenzyme A reductase and risk of fracture among older women. *Lancet* 2000;355:2185-2188.
100. Oxlund H, dalstra M, Andreassen T. T. Statin Given Perorally to Adult Rats Increases Cancellous bone Mass and Compressive Strength. *Calcif Tissue Int* 2001 ; 69 : 299-304.
101. Wonk Ricky W.K, Rabie M. Bakr A. Early healing pattern of statin-induced osteogenesis. *British journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2005; 43: 46-50.
102. Leem Kanghyun, Park Sun-Young, Lee Dong-Hwan, Hocheol Kim. Lovastatin increases longitudinal bone growth and bone morphogenetic protein-2 levels in the growth plate of Sprague-Dawley rats. *Eur J Pediatr* 2002; 161: 406-407.
103. Van der erden BC, Gevers EF, Lowik CW, Karperien M, Wit JM. Expression of estrogen alpha and beta in the epiphyseal plate of the rat. *Bone* 2002;30:478-85.

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AER	Apical Ectodermal Ridge (Apikal Ektodermal Kabartı)
ALP	Alkalen Fosfataz
ALS	Acid-Labile Subunit (Asit değişken Subunit)
BMP	Bone Morphogenetic protein (Kemik Morfogenetik Protein)
CBFA-1	Core Binding Factor-a 1
COMP	Cartilage Oligomeric Protein (Kartilaj Oligomerik Protein)
CRP	C-Reaktif Protein
DL	Desilitre
EDTA	Ethylenedinitrilotetraacetic Acid (Etilendinitrilotetraasetik Asit)
eNOS	Endothelial Nitric Oksit Sentaz
FGF	Fibroblast Growth Factor (Fibroblast Büyüme Faktörü)
FPP	Farnesil Pirofosfat
GGPP	Geranilgeranil Pirofosfat
GH	Growth Hormon (Büyüme Hormonu)
HDL	High density lipoprotein (Düşük Dansiteli Lipoptotein)
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A
HOX	Homeobox
IGF	Insulin-Like Growth Factor (İnsülin Benzeri Büyüme faktörü)
Ihh	Indian Hedgehog
LDL	Low density lipoprotein (Düşük Dansiteli Lipoptotein)
MG	Miligram

ML	Mililitre
MMP	Matriks Metalloproteinaz
NG	Nanogram
NO	Nitric Oksit
PAX	Paired Box
PDGF	Platelet Derived Growth Factor (Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü)
PI3K	Fosfatidilinozitol-3 Kinaz
PPAR- γ 2	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gama2
PTHrP	Parathyroid Hormon-Related Protein (Paratiroid Hormonla İlişkili Protein)
TGF- β	Transforming Growth Factor- β (Değiştirici Büyüme Faktörü – Beta)
Ü	Ünite
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü)
VLDL	Very low density lipoprotein (Çok Düşük Dansiteli Lipoptotein)

ŞEKİLLER ve RESİMLER DİZİNİ

Şekiller	Sayfa No
Şekil 1 (İnsan büyüme plağının histolojik görünümü)	15
Şekil 2 (Statinlerin kolesterol metabolizmasına etkisi)	22
Şekil 3 (Statinlerin ve HMG-CoA'nın kimyasal yapıları)	23
Şekil 4 (Statinlerin biyolojik etkileri)	26
Resimler	
Resim 1 (Femur distal metafizinin ortaya konması).....	31
Resim 2 (Atorvastatinin intraosseöz verilmesi)	32
Resim 3 (Femur ve tibia'nın makroskopik ölçümü).....	32
Resim 4 (Femurun ölçülmesi)	33
Resim 5 (Tibia'nın ölçülmesi)	33
Resim 6 (Grup 1 deki deneğin sağ femur A ve sol femur B distal büyüme plağının mikroskopik görünümü)	41
Resim 7 (Grup 1 deki deneğin sağ tibia A ve sol tibia B proksimal büyüme plağının mikroskopik görünümü)	41
Resim 8 (Grup 2 deki deneğin sağ femur A ve sol femur B distal büyüme plağının mikroskopik görünümü)	42
Resim 9 (Grup 2 deki deneğin sağ tibia A ve sol tibia B proksimal büyüme plağının mikroskopik görünümü)	42
Resim 10 (Grup 3 deki deneğin sağ femur A ve sol femur B distal büyüme plağının mikroskopik görünümü)	43
Resim 11 (Grup 3 deki deneğin sağ tibia A ve sol tibia B proksimal büyüme plağının mikroskopik görünümü)	43
Resim 12 (Grup 4 deki deneğin sağ femur A ve sol femur B distal büyüme plağının mikroskopik görünümü)	44
Resim 13 (Grup 4 deki deneğin sağ tibia A ve sol tibia B proksimal büyüme plağının mikroskopik görünümü)	44

TABLolar DİZİNİ

Tablolar	Sayfa No
Tablo 1 (Deney gruplarının sınıflandırılması)	29
Tablo 2 (Grupların sağ ve sol femur – tibia ölçümlerinin günlere göre cm cinsinden ölçümlerinin ortalama değerleri)	37
Tablo 3 (Grupların serum biyokimyasal değerlerinin günlere göre ortalamaları)	38
Tablo 4 (Femur distal büyüme plağı ve tibia proksimal büyüme plağı kalınlığının mikroskopik yöntemle ölçülen ortalamaları)	39
Tablo 5 (Femur distal büyüme plağı ve tibia proksimal büyüme plağı proliferatif bölgesinin 200 büyütmede mikroskopik alan başına düşen hücre sayımlarının ortalamasının gruplar arası dağılımı).....	40