

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PROSTASİKLİNİN RAT KRANİAL SÜTÜRLERİ ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Doç. Dr. Münip Gökhan TUNÇBİLEK

**İleri Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2006**

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PROSTASİKLİNİN RAT KRANİAL SÜTÜRLERİ ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Doç. Dr. Münip Gökhan TUNÇBİLEK

**İleri Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Figen ÖZGÜR**

**ANKARA
2006**

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne:

Bu çalışma jürimiz tarafından İleri Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Programında "Doktora Tezi" olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Yücel Erk
Hacettepe Üniversitesi

Danışman: Prof. Dr. Figen Özgür
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Emin Mavili
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Kemal Benli
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Serdar Gültan
Ankara Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hakan S. Orer
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yazar, bu çalışmanın gerçekleşmesine katkılarından dolayı, aşağıda adı geçen kişi ve kuruluşlara içtenlikle teşekkür eder.

Sayın Prof. Dr. Figen Özgür, tez danışmanım olarak çalışmaya yol gösterici katkılarda bulunmuştur.

Sayın Prof. Dr. Yücel Erk ve Prof. Dr. Emin Mavili tez izleme komitesinde görev alarak çalışmaya değerli katkılar sağlamışlardır.

Sayın Doç. Dr. Petek Korkusuz, çalışmanın histolojik değerlendirme bölümünün gerçekleştirilmesinde her türlü desteği sağlamıştır.

Sayın Ercüment Kiriş, çalışmada kullanılan İloprost maddesinin temininde katkıda bulunmuştur.

ÖZET

Tunçbilek, G. Prostatiklinin rat kranial sütürleri üzerindeki etkisinin incelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İleri Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Programı Doktora Tezi, Ankara, 2006.

Kraniosinostozların patogeneğinde, karışık ve uzun bir olaylar zincirindeki alt bir basamağının erken sütür kapanması işlemini başlattığı ve *Transforming growth factor-beta* ve *basic fibroblast growth factor* gibi çeşitli büyüme faktörlerinin sütürleri etkileyerek kapanma işleminde rol oynadıkları bilinmektedir. Çeşitli prostaglandinler, kemik metabolizmasının lokal kontrol mekanizmalarında görev yapmaktadır. Prostaglandinlerin uzun kemikler üzerindeki etkileri hakkında geniş klinik ve deneysel bilgi bulunmakla beraber kranial kemik ve sütürler üzerindeki etkileri ile ilgili son derece sınırlı bilgi mevcuttur. Bu çalışmada, prostatiklin analogu iloprostun rat kranial sütürleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu amaçla, oluşturulan deney gruplarına 10 ve 15 µg/kg(vücut ağırlığı)/gün dozunda iloprost intraperitoneal olarak verilmiştir. İloprostun kemik üzerindeki etkilerini antagonize etmek için üçüncü bir grup oluşturulmuş ve iloprost 15 µg/kg(vücut ağırlığı)/gün + deksametazon 2 mg/kg/gün, intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Deney başlangıcından 15, 30 ve 45 gün sonra 4'er hayvan sakrifiye edilerek frontal ve sagittal sütürü içeren kemik örnekleri alınmıştır. Alınan örneklerin yarısında immünohistokimyasal, diğer yarısında da rutin histolojik inceleme yapılmıştır. Ratların kafataslarında standart noktalarda morfolojik ölçümler yapılmıştır. Sonuçların histolojik değerlendirilmesinde gerek sagittal gerekse frontal sütür örneklerinde iloprost verilen gruplarda sütür hattında kemikleşmenin arttığı ve hızlandığı saptanmıştır. İmmünohistokimyasal incelemede ise *TGF-β* ve *FGF* ekspresyonlarının arttığı gözlenmiştir. İloprost+deksametazon verilen grupta ise iloprost etkisinin inhibe olduğu görülmüştür. Morfolojik ölçümlerde deney grupları ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmıştır. İloprostun, uygulanan dozlarda sıçanlarda kalvariyal sütürlerin tam kapanmasını sağlamadığı; ancak daralma ve kemikleşme sürecini ikinci haftanın sonundan itibaren daha belirgin olmak üzere arttırdığı ve bu etkinin deksametazon ile engellenebildiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Prostatiklin, iloprost, kranial sütür.

ABSTRACT

Tunçbilek, G. Effects of prostacyclin on rat calvarial sutures. Ankara 2006. Premature fusion of calvarial sutures is initiated in an earlier step of a long and complex reaction and several growth factors including transforming growth factor β and basic fibroblast growth factor have an important role to effect calvarial sutures in this premature fusion event. Several prostaglandins influence important functions in local bone modeling and remodeling by autocrine and paracrine mechanisms. Much more is known about the effects of prostaglandins on long bones, little is known about the effects of prostaglandins on calvarial bones and sutures. In this study we investigated the effect of iloprost - an prostacyclin analogue on rat calvarial sutures. In two study groups iloprost was injected intraperitoneally 10 and 15 $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{day}$, respectively. In the third group dexamethasone 2 mg / kg / day + iloprost 15 $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{day}$ was injected intraperitoneally to antagonize the effect of iloprost on bone tissue. In every group, four rats were sacrificed at the postoperative 15, 30 and 45 days and specimens including the sagittal and frontal sutures were excised immediately. Routine histological and immunohistological examinations were performed on the specimens. Skulls of the rats were measured between the standard points, also. In histological evaluation, bone formation in the both frontal and sagittal suture area was increased and became faster in iloprost groups. Dexamethasone inhibited the bone formation effect of iloprost on the third group. Expressions of TGF- β and FGF were also increased in immunohistological studies. In morphological measurements statistically significant differences were found between control and study groups. Iloprost did not fused the rat calvarial sutures prematurely but increased the bone formation in the sutural area especially after the second week of the study. This effect of the iloprost can be antagonized with dexamethasone

Key word: Prostacyclin, iloprost, cranial suture

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Kranial sütünler	3
2.2 TGF- β ve Sütün Biyolojisi	7
2.3 Fibroblast Bnyeme Fakt6rleri	8
2.4 Prostaglandinler	8
3. GEREÇ VE Y6NTEM	14
3.1 Deney Protokol6	14
3.2 Morfolojik 6lç6m Y6ntemi	15
3.3 Histolojik Gereç ve Y6ntem	16
3.4 İstatistiksel Y6ntem	20
4. BULGULAR	21
4.1 Morfolojik 6lç6m Değerleri	21
4.2 Histolojik Bulgular	24
4.3 Histolojik sütün iyileşmesinin morfolojik 6lç6mlerle korelasyonunun değerlendirilmesi	47
4.4 İmm6nohistolojik TGF- β 1 ve FGF-2 işaretlenmesinin morfolojik 6lç6mlerle korelasyonunun değerlendirilmesi	47
5. TARTIşMA	49
6. SONUÇ	60
7. KAYNAKLAR	62

SİMGELER VE KISALTMALAR

TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
BMP	<i>Bone Morphogenic Protein</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FGF-R	<i>Fibroblast growth factor reseptörleri</i>
HPETE	Hidroperoksiieikosatetraeonic asit
HETE	Hidroksieikosatetraeonic asit
PG I ₂	Prostasiklin
PG F ₂ α	Prostaglandin F ₂ α
PG E	Prostaglandin E
Dek	Deksametazon

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 3.1. Temizlenmiş rat kraniumları	15
Şekil 3.2. Rat kranium ölçüm metodu	16
Şekil 4.1.	26
Şekil 4.2.	30
Şekil 4.3.	32
Şekil 4.4.	34
Şekil 4.5.	36
Şekil 4.6	38
Şekil 4.7	42
Şekil 4.8	44

TABLÖLAR

	Sayfa
2.1. Kraniosinostozların etyolojik ve patogenetik heterojeniteleri	4
2.2. Prostaglandin sentez mekanizması	10
3.1. Histolojik skörlama sistemi	18
3.2. İmmünhistokimyasal skörlama sistemi	20
4.1. Morfolojik ölçüm değeri	21
4.2. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan morfolojik ölçüm değeri	22
4.3. Histolojik değeriendirme sonuçları	25
4.4. İmmünhistokimyasal değeriendirme sonuçları	41

1. GİRİŞ

Kranial sütürler, kranial kemiklerin birbirleri ile olan ilişkisini meydana getiren oluşumlar olup kranial kubbenin bütünlüğünü sağlarlar. Kranial sütürler, ikinci yaşta kapanan metopik sütür hariç, ikinci veya üçüncü dekadlarda kapanmaya başlar. Kranial sütürlerin normalden erken kapanması işlemi kraniosinostosis olarak adlandırılır. Erken kapanan sütürler kendilerine özgü kafa şekillerini oluştururlar. Bu şekillenmenin prensipleri ilk olarak 1851'de Virchow tarafından tariflenmiştir. Virchow Kanunu'na göre kapanan sütür yönüne dik olan doğrultuda kranial büyüme durmakta, açık sütür bölgelerinde ise beyin gelişimini rahatlatacak aşırı büyüme olmaktadır. Büyümekte olan bir çocuğu ve ailesini gerek fiziksel gerekse psikolojik olarak olumsuz etkileyen kraniosinostozların etyolojileri ve gelişim basamakları hakkında önemli bilgilere ulaşılmakla beraber henüz açıklığa kavuşturulmamış çok sayıda nokta mevcuttur.

Karışık ve uzun bir olaylar zincirinde daha alt bir basamak erken sütür kapanmasını başlatmakta, çeşitli büyüme faktörleri de sütürleri etkileyerek parakrin yolla kapanma işlemini organize etmektedir. *Transforming growth factor-beta*, *basic fibroblast growth factor* ve *insulin-like growth factor-II* bu işlemlerde rol oynayan büyüme faktörleri arasındadır.

Prostaglandinler, sentezlendikleri dokularda etkilerini gösteren ve aynı bölgelerde hızla metabolize edilen lokal kimyasal ajanlardır. Özellikle PG E, lokal olarak, kemik dokuların rezorbsiyon ve yapımını

kontrol eden bir sistem içinde görev yapmaktadır. Uzun süreli sistemik prostaglandin E tedavisi alan çocuk hastaların uzun kemiklerinde pretibial ödem ve hassasiyeti takiben kortikal hiperostosis geliştiği bildirilmiştir. PG E'nin uzun kemikler üzerindeki etkileri hakkında geniş klinik ve deneysel bilgi bulunmakla beraber prostaglandinlerin kranial kemik ve sütürler üzerindeki etkileri ile ilgili son derece sınırlı bilgi mevcuttur. Literatür incelemesinde uzun süreli PG E tedavisi alan çocuk hastalarda kranial sütürlerde geri dönüşümlü bir genişleme olduğunu bildiren iki olgu sunumu haricinde konu ile ilgili bilgiye rastlanamamıştır.

Bu çalışmada stabil bir prostasiklin (PG I₂) analogu olan ve klinik kullanımı mevcut olan iloprostun yenidoğmuş rat kranial sütürleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kranial Sütürler

Kranial kemiklerin birbirleri ile olan ilişkisini oluşturan sütürler, kemiklerin kenarları boyunca uzanır ve ince fibröz bir tabaka ile kemik kubbenin devamlılığını sağlar. Kranial sütürler, doğum sırasında kranial kemiklerin üst üste binmesine izin vererek kafanın doğum kanalından geçişini kolaylaştırır. Oluşan şekil değişikliği doğum sonrası birinci haftada düzeldikten sonra kranial genişleme ve sütürlerin açılması normale döner. Çocuğun büyümesi ile sütürler beyin gelişimine paralel olarak kranial kubbenin büyümesi ve şekillenmesine izin verirler. Kranial sütürlerin testere dişi şeklindeki yapısı, travma gibi dış kuvvetlerle kemiklerin birbirinden ayrılmalarını önler. Erken çocuklukta maruz kalınan minör travmalarda ortaya çıkan mekanik stresler de sütürlerin hafif harekete izin vermesi ile absorbe edilir.

Bir veya daha fazla sütürün erken kapanması kraniosinostosis olarak adlandırılmaktadır. Kraniosinostosis terimi daha sık kullanılmakla beraber, teknik olarak kraniosinostosis erken sütür kapanması işlemi, kraniosinostosis ise ortaya çıkan sonucu tarif etmektedir.

2.1.1. Sinostoz Histolojisi

Kraniosinostozlar bir noktadan başlayarak sütür hattı boyunca ilerlediği için hat boyunca değişik derecelerde kapanma alanları saptanabilir (1). Kapanmanın tam olduğu kısımlarda, sütür boşluğu boyunca non-lameller kemik içeren, tam kemiksel daralma alanı görülür. Tam kapanma alanının yakınlarında, bazı sütür bağ dokusu

elemanlarının eşlik ettiği non-lameller kemik dokusu oluşumu ile seyreden kısmi kapanma alanları izlenir. Daha distal bölgelerde, kemik kenarlarında belirgin değişikliklerin olduğu ve sütürün bağ dokusu kısmında daralma ile seyreden, kemikleşmek üzere olan bir alan tespit edilir. Kemikleşmenin olmadığı bölgelerde ise sütür boşluğunda belirgin bağ dokusu içeren sütürler görülmektedir.

2.1.2. Etyoloji

Sütür kapanması vasküler, hormonal, genetik, mekanik ve lokal faktörlerden etkilenmektedir. Ancak erken sütür kapanmasının kesin sebebi halen bilinmemektedir. Kraniosinostozlar etyoloji ve patogenez açısından heterojenite içermektedir. Değişik etyolojik faktörler değişik patogenez mekanizmaları üzerinden benzer fenotipik görüntüye yol açabilmektedir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1: Kraniosinostozların etyolojik ve patogenetik heterojeniteleri (2).

ETYOLOJİ	PATOGENEZ	FENOTİP
Otozomal dominant gen →→	Mezenşimal blastema →→→→	
Hipertiroidizm →→→→→	Hızlanmış kemik maturasyonu →	Kraniosinostoz
Mikrosefali →→→→→→→→	Sütürler arası gerim →→→→ kuvvetinin azalması	

2.1.3. Primer Kraniosinostozlar

Monojenik sebepler: Basit kraniosinostozların önemli bir kısmı sporadik olmakla beraber ailevi etyolojiye sahip olanlara da rastlanmaktadır (3-6). Kraniosinostozlu hastaların %8'inde aile öyküsünün pozitif olduğu

gösterilmiştir. Otozomal dominant kalıtım genel olarak rastlanan kalıtım tipidir.

Kromozomal patolojiler: Çok değişik kromozomal patolojilerin kraniosinostozlara eşlik ettiği gösterilmiştir (7). Bazılarında kraniosinostozlara sık olarak rastlanırken, bazılarında kraniosinostozlar nadir olarak görülmektedir.

2.1.4. Sekonder Kraniosinostozlar

Primer kraniosinostozlar daha sık görülmekte ve bir veya daha çok sütürü etkileyebilmektedirler. Sekonder kraniosinostozlarda ise tanı konulan başka bir patoloji sinostoza yol açmaktadır.

Hipertiroidizm: Hipotiroidi için tiroid hormon tedavisi gören (8) veya tirotoksik guatrı (9-12) olan hastalarda kranial sütürlerin erken kapanması gözlenen bir bulgudur.

Rikets: Kraniosinostoz, değişik etyolojik nedenlerle ortaya çıkan rikets hastalarında rapor edilmiştir (13 - 15). Hastalığın şiddeti sinostozun gelişim ve şiddeti ile doğru orantılıdır. Riketsin başlama yaşı da kraniosinostoz şiddetini arttırmaktadır. Yüksek alkalin fosfataz değerleri de kraniosinostoz sıklığını doğru orantılı olarak etkilemektedir.

Mukopolisakkaridoz ve mukolipidozlar: Kraniosinostozlar; Hurler sendromu, Morquio sendromu, β -glukoronidaz eksikliği, mukolipiozis III ve α -D-mannozidaz eksikliği gibi çeşitli mukopolisakkaridoz ve mukolipidozların eşlik eden bir bulgusudur (16,17).

Hematolojik bozuklular: Talasemiler, orak hücreli anemi, konjenital hemolitik ikter ve polisitemi vera gibi hematolojik bozukluklarda

kraniosinostoz ortaya çıkabilmektedir. Kemik iliği hiperplazisi ve kompensatuar kemik büyümesi kalvarial sütürleri erken kapatabilmektedir (17,18).

Teratojenler: Difenilhidantoin, retinoidler, valproat, aminopterin, flukonazol ve siklofosfamide bağlı olarak gelişen kraniosinostozlar bildirilmiştir (2).

Holoprosensefali: Metopik sütün yokluğu holoprosensefaliye eşlik eden bir bulgudur (19).

Mikrosefali: Merkezi sinir sisteminin büyümemesi sütürlere etki eden streslerde azalma yaratacağından sinostozu yol açmaktadır. Kranial sütürler tamamen kapanmakta veya zor olarak seçilebilmektedir. Artmış intrakranial basınç bulgusuna rastlanmamakta ve kalvaryal kemikler kalınlaşmaktadır.

Enfalosel: Kraniosinostozlar zaman zaman enfalosellere eşlik etmektedir (20). Enfalosel sütürlere etki eden büyüme streslerini azaltarak sinostozu neden olabilmektedir (21). Eşlik eden hidrosefali varlığında şantlarla basınç azaltılması sonucunda da benzer bir etyoloji ile sinostoz gelişebilmektedir. Sendromlarda enfalosel ve kraniosinostoz aynı mutant genin etkisi sonucu birlikte ortaya çıkabilmektedir (22).

Şanlı hidrosefali: Kemiklerin ve sütünlerin genişlemesini stimüle eden kuvvetlerin şantlar aracılığı ile ani olarak azaltılması sonucu ortaya çıkmış kraniosinostoz olguları bildirilmiştir (23).

2.2. Transforming growth factor β ve Sütür Biyolojisi

Transforming growth factor β (TGF β) ailesi, yirmiden fazla değişik molekülden oluşan ve normal büyüme ve gelişmede hücre farklılaşması, hareketlilik, organizasyon ve ölüm gibi anahtar olaylarda rol oynayan bir polipeptid grubudur (24 - 26). Bunlar TGF β , *Bone Morphogenic Protein* (BMP) ve aktivinler olarak üç ana grupta sınıflandırılmışlardır. TGF β 'nın en önemli etkisi osteoblastik farklılaşmayı ve matriks oluşumunu indüklemesidir. TGF β , osteoid oluşumunu stimüle etmekle beraber mineralizasyonu inhibe eder. BMP, yapısal benzerliği nedeniyle aynı aileye dahil olmakla beraber farklı etkilere sahiptir ve örneğin mineralizasyonu stimüle eder. BMP'lerin fetal kemik oluşumu ve gelişiminde rol oynadığı, TGF β 'nın da gelişmiş kemiklerde ve yeniden şekillenmede rol oynadığı düşünülmektedir.

TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3 izoformlarının gelişmekte olan rat kranial sütürleri üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada sütürlerin kapanma aşamasında TGF β 1 ve TGF β 2 aktivitelerinin devam ettiği ancak TGF β 3 aktivitesinde azalma olduğu saptanmıştır (27). Açık olan sütürlerde ise TGF β 3 immünreaktivitesinde artış, TGF β 1 ve TGF β 2 aktivitelerinde ise azalma olduğu gösterilmiştir. Üç izoform içinde TGF β 2 immün reaktivitesinin aktif olarak kapanmakta olan sütürlerde en belirgin aktiviteyi gösterdiği saptanmıştır (28,29). TGF β 'nın sütürlerin erken kapanmasında ikincil bir rolü olduğu düşünülmektedir. Karışık bir olaylar zincirinde daha erken bir basamağın kapanmayı tetiklediği, TGF β 'nın bu

zincir içindeki rolünün kesin olduğu ancak kraniosinostozlar için primer bir faktör olmadığı düşünülmektedir (30,31).

2.3. Fibroblast Growth Factors – Fibroblast Büyüme Faktörleri

Fibroblast growth factor (FGF) ailesi, yapısal olarak benzer 19 polipeptid mitojenden oluşan bir gruptur. İlk olarak mezodermal kaynaklı hücreler için mitojenik oldukları gösterilmişse de daha sonraları ektodermal, nöroektodermal ve endodermal kaynaklı hücreler için de mitojenik oldukları gösterilmiştir. FGF'ler gelişimsel indüksiyon ve farklılaşma, hücre büyümesi ve göçü, kemik büyümesi ve gelişimi, nöronal farklılaşma, anjiogenez, yara iyileşmesi ve tümör oluşumu gibi çeşitli alanlarda etkinlik göstermektedir (32).

FGF reseptörleri (FGF-R 1-4), önemli derecede benzerlik gösteren dört adet transmembranöz tirozin kinaz reseptöründen oluşan bir ailedir. Çeşitli çalışmalarda, özellikle FGF-R1 ve FGF-R2'deki mutasyonların kraniosinostoz sendromları ile ilişki gösterdiği saptanmıştır (30, 31, 33-35). FGF ailesi içinde önemli bir yer tutan bazik FGF'nin (FGF-2) epitel-mezenşim etkileşimleri, ekstremitte şekillendirilmesi, kırık iyileşmesi ve kemik büyümesi üzerinde önemli rolleri mevcuttur (36,37). Ayrıca kranial suturelerin kapanma aşamalarında da bazik FGF immün boyanmasında artış olduğu gösterilmiş ve suture kapanması sırasındaki osteogenezde rolü olduğu saptanmıştır (38-39).

2.4. Prostaglandinler

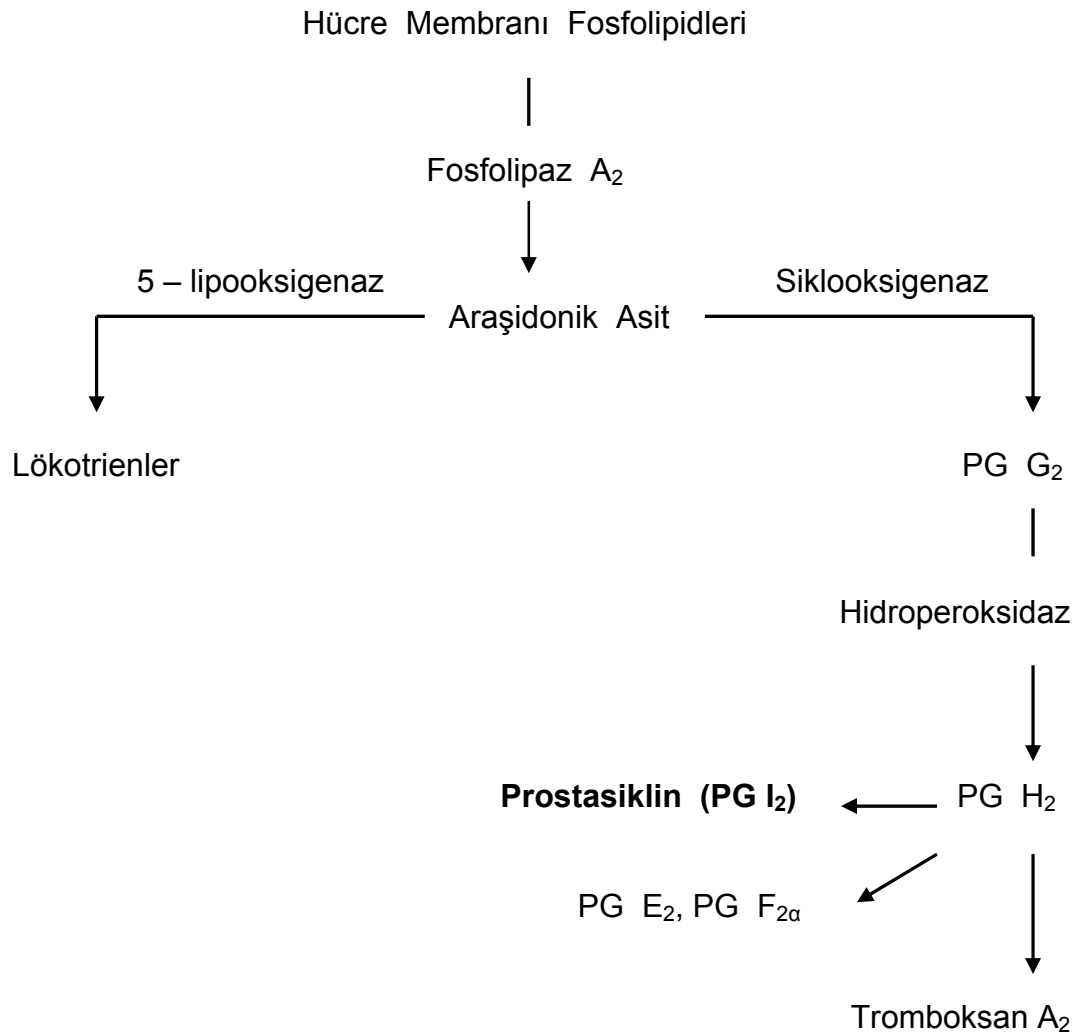
Prostaglandinler, 20 karbonlu, doymamış yağ asidine bağlı siklopentan halkası temeline dayalı olarak hemen hemen tüm dokularda

az miktarlarda sentezlenen lokal mediatörlerdir. Genellikle sentezlendikleri dokularda işlev görür ve aynı bölgelerde hızla metabolize edilirler. Dolayısıyla kan dolaşımında belirgin konsantrasyonlarda bulunmazlar. Tromboksanlar, lökotrienler, hidroperoksieikosatetraeonic asit (HPETE) ve hidroksieikosatetraeonic asit (HETE), prostaglandinler ile aynı prekürsörlerden, benzer yollar kullanılarak sentezlenen lipidlerdir.

Prostaglandin sentezi: Yirmi karbonlu bir yağ asidi olan araşidonik asit prostaglandin ve benzer bileşiklerin temel prekürsürüdür. Araşidonik asit, hücre membranındaki fosfolipidlerin bir bileşeni olarak bulunur ve fosfolipaz A₂ enzimi ile serbest hale geçer. Lipooksigenaz yolunu takip eden araşidonik asitlerden düz zincirli yağ asitlerinin hidroksile edilmiş türevleri olan lökotrienler, HPETE ve HETE sentezlenir. Siklooksigenaz yolundan ise halka yapılı eikosanoidler olan prostaglandinler, prostasiklin (PG I₂) ve tromboksan sentezlenir (Tablo 2.2).

Prostaglandinler, hücre membranında adenilsiklazı aktive veya inhibe ederek etki eder. PG F₂α, lökotrienler ve tromboksan A₂ ise hücre içi Ca⁺⁺ düzeyini arttırarak etki gösterir.

Prostaglandinler, endojen olarak sentezlendikleri dokularda, spesifik bir hücre yanıtının ince ayarını yapan lokal kimyasal ajan olarak etkili olmakta ve ağırlıklı olarak allerjik ve inflamatuvar yanıt mekanizmalarında rol oynamaktadırlar.

Tablo 2.2: Prostaglandinlerin sentez mekanizması

Prostaglandinler genel olarak sentezlendikleri dokularda işlev gören ve aynı bölgelerde hızla metabolize olan lokal mediatörler olmalarından dolayı kan dolaşımında belirgin konsantrasyonlarda bulunmazlar ve sistemik tedavilerde kullanımları sınırlıdır. Sistemik kullanım sonucunda oluşan ateş, diare, hipotansiyon, apne gibi yan etkilerine rağmen, özellikle PG E, yüksek cerrahi risk içeren ve patent duktus arteriosusa bağlı konjenital siyanotik kalp hastalığı olan

çocuklarda kullanım alanı bulmuştur. Stabil bir prostasiklin analogu olan iloprost ise pulmoner hipertansiyonlu çocuklarda akciğer vasküler yatağının vazodilatasyonunda ve periferik damar hastalığı olan hastalarda periferik vazodilatasyon amacı ile sistemik olarak kullanılmaktadır.

2.4.1. Prostaglandinlerin Kemik Dokusu Üzerine Etkileri

Prostaglandinlerin kemiklerin yeniden şekillendirilmesi üzerine önemli etkileri olduğu bilinmektedir. Çeşitli prostaglandinlerin lokal sentez ve salınımı, kemik rezorpsiyon ve yapımını kontrol eden hormonal bir mekanizma olarak görev yapmaktadır. Diş dokularında oluşan ortodontik mekanik stresler sonucu sentezlenen ve salınan PG E, osteoklastik kemik rezorpsiyonunu stimüle etmektedirler (40, 41). Tibia kırıklarından sonra kemik ve kastan salınan prostaglandinlerin osteogenik hücre proliferasyonu, lokal vazodilatasyon ve kemik rezorpsiyonunda yer aldığı düşünülmektedir (42, 43).

Prostaglandin E serisinin *in vitro*, *in vivo* ve patolojik durumlarda kemik rezorpsiyonunu indüklediği Ueno (44) ve Conaway'ın (45) çalışmalarında detaylı olarak özetlenmiştir. Ancak bu çalışmalarda elde edilen bilgilerden farklı olarak prostaglandinlerin kemik oluşumunu stimüle edici etkileri hakkında gerek deneysel (44, 46 - 51) gerekse de klinik (52 - 54) çeşitli çalışmalar da bulunmaktadır.

Prostaglandinler ve kemik metabolizması ile ilgili çalışmalarda çoğunlukla PG E'nin etkileri incelenmiş olmakla beraber prostasiklin'in (PG I₂) kemikler üzerindeki etkilerini inceleyen sınırlı sayıdaki çalışmalar

da mevcuttur. Farr (55) PG I₂'inin, diğer prostaglandinlere benzer şekilde, rat kalvariumundan hazırlanan hücre kültürlerinde rezorbsiyon yaptığını göstermiştir. Rawlinson (56) kültür ortamına yerleştirilmiş kansellöz kemiklere siklik olarak uygulanan mekanik yüklemenin, kemik hücrelerinden PG E₂ ve PG I₂ salınımına yol açtığını göstermiştir. Yüzey hücreleri ve osteositlerden salınan PG I₂'nin, osteositlerde RNA sentezini indüklediği ve bu yolla kemik şekillenmesi ve yeniden şekillenmesine yol açtığını belirtmişlerdir. Yine Rawlinson ve diğ. tarafından yapılan bir çalışmada, kültür ortamına yerleştirilmiş kansellöz kemiklere dışardan verilen prostasiklinin, RNA sentezini ve *insülin-like growth factor-II* (IGF-II) sentezini arttırdığı gösterilmiştir (57). Artmış IGF-II sentezi ile prostasiklinin osteojenik aktiviteyi stimüle ettiğini ileri sürmüşlerdir. Glantschnig (58) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada kültüre edilmiş osteoblast benzeri hücrelere uygulanan 2 atm basıncın *c-fos* gen ekspresyonunu arttırdığını göstermişlerdir. Kemik hücre fizyolojisinde önemli bir role sahip olan *c-fos* gen ekspresyonundaki artışa paralel olarak prostasiklin sentezinde de bir artış olduğu, dışardan ortama verilen stabil prostasiklin analogu iloprost ve PG E₂'nin de *c-fos* ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Prostasiklinin kemik hücrelerine uygulanan basınca bağlı artan *c-fos* gen ekspresyonunda ara kademedeki görev aldığı iddia edilmiştir.

Uzun süreli sistemik PG E₁ tedavisi alan hastalarda uzun ekstremite kemiklerinde pretibial ödem ve hassasiyeti takiben kortikal hiperostosis gelişimi bildirilmiştir (59 -61). Prostaglandinlerin kemik dokular

ve özellikle uzun kemikler üzerindeki etkileri ile ilgili geniş klinik ve deneysel bilgi bulunmakla beraber kranial sütürler üzerindeki etkileri ile ilgili bilgiler son derece sınırlıdır. Konjenital siyanotik kalp hastalığı nedeniyle doğum sonrası 2 – 4. günlerde PG E₁ ve E₂ tedavisi başlanan ve uzun dönemli (90 – 110 gün) devam ettirilen hastalarda kranial sütürlerde geri dönüşümlü bir genişleme olduğunu bildiren iki olgu sunumu haricinde literatürde konu ile ilgili yayına rastlanamamıştır (62, 63).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Protokolü

Ratlar, *in vivo*, kranial sütür çalışmaları için ideal bir model olarak kabul edilmiş olup, bu çalışmada Wistar ratları kullanılmıştır. Literatürde konu ile ilgili çalışmaya rastlanamadığı için iloprost dozu için, iloprostun ratlarda ekstrakranial amaçlarla kullanıldığı çalışmalar incelenmiştir (75 – 78). Bu çalışmalarda 1 – 30 $\mu\text{g} / \text{kg}$ (vücut ağırlığı) / gün arasında değişen dozlar kullanıldığı görülmüştür.

Çalışmada, her grupta 12 adet olmak üzere, 7'şer günlük toplam 48 adet Wistar rat kullanıldı. Birinci deney grubuna stabil bir prostasiklin analogu olan iloprost (Schering AG, Berlin, Almanya), 10 $\mu\text{g} / \text{kg}$ (vücut ağırlığı) / gün dozunda, ikinci deney grubuna ise 15 $\mu\text{g} / \text{kg}$ (vücut ağırlığı) / gün dozunda, intraperitoneal olarak, verildi. Ayrıca prostasiklinin kemik üzerindeki etkilerini antagonize etmek için üçüncü bir deney grubu oluşturuldu ve bu gruba iloprost 15 $\mu\text{g} / \text{kg}$ (vücut ağırlığı) / gün ve deksametazon 2 mg / kg / gün, intraperitoneal olarak, verildi. Kontrol grubuna ise günlük olarak intraperitoneal serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı.

Hayvanlara, Hacettepe Üniversitesi Cerrahi Araştırma Laboratuvarında bakıldı ve standart rat diyeti ile beslendi. Her grupta deney başlangıcından 15, 30 ve 45 gün sonra 4'er hayvan sakrifiye edildi.

Ratlar sakrifiye edilir edilmez, sagital ve frontal sütürü içerecek Şekilde kemik örnekleri alındı (Şekil 3.1).

Şekil 3.1: Sakrifiye edildikten sonra kemik örnekleri alınan ve ölçüm için temizlenen 45 günlük rat kraniumları.



Alınan rnekler iki parçaya bölünerek bir yarısı -196°C 'de sıvı azotta dondurulduktan sonra immün işaretleme yapılıncaya kadar -80°C 'de derin dondurucuda saklandı. Diğer yarı ise fosfat tamponu içinde hazırlanmış %10'luk formol ($\text{pH}=7.0$) zeltisiyle tespit edildi.

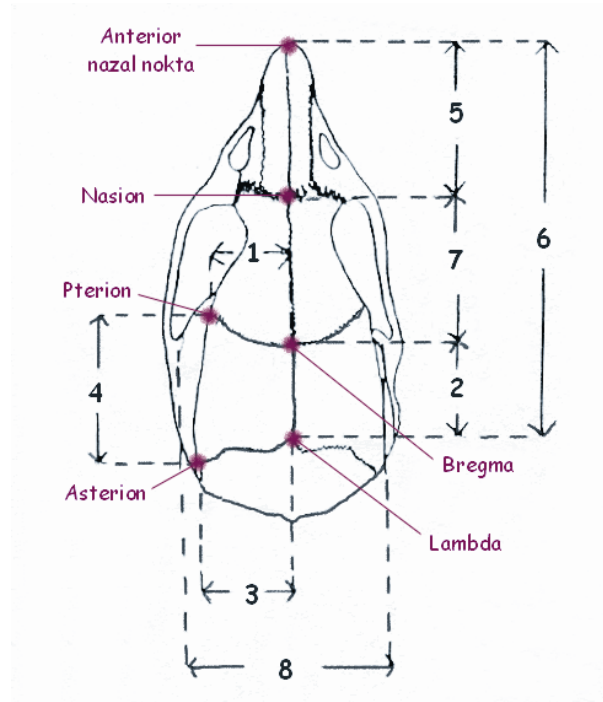
Çalışma H. Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 29.6.2006 tarih ve 2006 / 44-6 numaralı kararı ile onaylandı.

3.2. Morfolojik lm Yöntemi

Sakrifiye edilen ratların kafatasları yumuŐak dokulardan aktif enzinli deterjan tekniği (80) ile temizlendikten sonra, bir kompas yardımı ile Moss metoduna uygun olarak morfolojik ölçümler (mm.) yapıldı (Şekil 3.2).

Şekil 3.2: Rat kraniumunda referans alınan noktalar ve ölçülen uzunluklar (64).

- 1-Pterion – bregma arası uzunluk
- 2-Bregma - lambda arası uzunluk
- 3-Lambda - asterion arası uzunluk
- 4-Asterion - pterion arası uzunluk
- 5-Nazal uzunluk
- 6-Nazal - lambda arası uzunluk
- 7-Projektif frontal uzunluk
- 8-Skuamozal genişlik



Her ölçüm 3 kez tekrarlandı ve ortalaması alındı.

3.3. Histolojik Gereç ve Yöntem

3.3.1. Doku örneklerinin hazırlanması:

Doku örnekleri iki gruba ayrıldı. Bir kısmı -196°C 'de sıvı azotta dondurulduktan sonra immün işaretleme yapıncaya kadar -80°C 'de derin dondurucuda saklandı. Diğer grup fosfat tamponu içinde hazırlanmış %10'luk formalin (pH=7.0) çözeltisiyle tespit edildikten sonra distile su içindeki % 10'luk EDTA çözeltisinde oda sıcaklığında kontrollü olarak dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyon sonrası dereceli alkollerden geçirilerek sabit vakum uygulamasıyla parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan rotary mikrotomda (Microm, HM 360, Almanya) jelatinle kaplı lamlara $6-8\ \mu\text{m}$

kalınlığında kesitler alındı. Derin dondurucuda saklanan doku örneklerinden cryostatta yine jelatin ya da *poly-L-lysin* ile kaplı lamlara 5-7 µm kalınlığında kesitler alındı.

3.3.2. Parafin bloklarda histolojik inceleme

Elde edilen histolojik kesitler hematoxilen-eozin ve Goldner'in modifiye Mallory trikrom tekniği ile boyandı. Tüm kesitler Leica marka DMR model ışık mikroskopunda değerlendirildi. Görüntüler DC 500 model Leica marka dijital kamera ile bilgisayar ortamına aktarıldı. Doku örnekleri temel olarak sütür hattının kemikleşmesi, kortikal kemiğin ve ilik boşluğunun yeniden yapılanması açısından değerlendirildi. Bu amaçla semi-kantitatif bir skorlama sistemi ilgili literatürden alınarak kullanıldı (65). Adı geçen yöntem göre defekt alanındaki yeni kemik oluşumu, korteksin yeniden yapılanması (remodelling) ve kemik iliğindeki değişiklikler skorlanarak değerlendirildi (Tablo 3.1). Tüm kesitler, birbirinden bağımsız en az iki araştırmacı tarafından değerlendirilerek bunlardan elde edilen skorların ortalamaları esas alındı.

Tablo 3.1: Histolojik olarak sütür iyileşmesini değerlendirmede kullanılan skorlama sistemi görülmektedir.

Kategori:		Skor
Defekt alanında yeni kemik oluşumu	Endokraniyal ya da ektokraniyal tam kemik köprünün oluşumu	3
	Endokraniyal ya da ektokraniyal orta derecede kemik oluşumu (ara dokunun %50'sinden fazlası boyunca köprü oluşturuyor)	2
	Endokraniyal ya da ektokraniyal düşük derecede kemik oluşumu (ara dokunun %50'sinden azı boyunca köprü oluşturuyor)	1
	Yeni kemik köprünün hiç oluşmaması	0
Korteksin yeniden yapılanması (remodeling)	Tümüyle yeniden yapılanan korteksin varlığı	2
	Medulla boşluklarının varlığı	1
	Yeniden yapılanmanın hiç olmaması	0
Kemik iliğinin yeniden yapılanması	Erişkin tipi yağlı iliğin oluşması	4
	İliğin 2/3'nde yeni doku oluşması	3
	İliğin 1/3'nde yeni doku oluşması	2
	Fibröz doku oluşumu	1
	Kırmızı ilik	0
Maksimum Toplam Skor:		9

3.3.3. İmmünohistokimyasal inceleme:

Sıvı azotta dondurulan örnekler immün işaretleme yapılınca kadar -80 °C'de derin dondurucuda saklandı. Doku kesitlerine TGF-β1 ve FGF-2 için immün işaretleme yapıldı. İmmünohistokimyasal çalışmada *frozen* kesitler için indirekt immünoperoksidaz ve immnfluoresan yöntemi uygulandı (66,67). Dondurulan kesitler on dakika süreyle 4°C'de soğuk aseton ile tespit edildikten sonra otuz dakika süreyle açık havada kurutuldu. Daha sonra kesitler dakopen (Dako, Danimarka) ile sınırlandı ve altmış dakika süreyle

1/10 ila 1/100 dilüsyondaki tavşan anti rat primer antikorlarla (TGF- β 1 ve FGF-2, #sc146 ve #sc79, Santa Cruz, ABD) oda ısısında ya da 4°C'de nemli ortamda inkübe edildi. Bundan sonra immun peroksidaz yöntemiyle işaretlenecek kesitler 0.01 M PBS (*Phosphate Buffered Saline* - fosfat tamponlu serum fizyolojik, pH: 7.4) ile yıkandıktan sonra peroksidaz aktivitesi için diaminobenzidin (DAB) ile konjuge geniş spektrumlu görüntüleme kiti (*Histostain plus kit #859643*, Zymed, ABD) ile kitin uygulama basamakları ve sürelerine uygun olarak işaretlendi. İmmün fluoresan yöntemle işaretlenecek kesitler, aynı koşul ve sürelerde primer antikorla inkübe edildikten sonra 0.01M PBS (*Phosphate Buffered Saline* - fosfat tamponlu serum fizyolojik, pH: 7.4) ile yıkanarak *Alexa fluor* ile konjuge edilmiş keçi anti-tavşan sekonder antikorla (#A-10436, Molecular Probes, ABD) oda ısısında 30 dakika süreyle inkübe edildi.

Tüm primer antikorlar ve alexa ile işaretli sekonder antikör, zemin işaretlenmesini azaltıcı, % 0.1 *tween* içeren 0.05 M TrisHCl çözeltisiyle (#S3022, Dako, Danimarka) sulandırıldı. PBS ile yıkadıktan sonra bir dakika süreyle Mayer'in hematoksileni ile zemin boyaması uygulanan immünperoksidaz yöntemiyle işaretlenmiş kesitler, entellan ile kapatıldı. Alexa ile işaretli kesitlerin üzerleri sekonder antikörle inkübasyon ve PBS ile yıkama sonrası doğrudan 1:1 oranında aköz fluoresan *mounting medium* (#S3025, Dako, Danimarka) ve propidyum iyodit, (Anchor, ABD) ile lamelle kapatıldı. Primer antikör aşaması atlanarak ve bağlantısız bir test antikörü primer antikör olarak damlatılmak suretiyle sırasıyla pozitif ve negatif kontrol boyamaları yapıldı.

Tüm kesitler fluoresan ekli Leica marka DMR model ışık mikroskopunda spesifik işaretlenme açısından değerlendirildi. Görüntüler DC 500 model Leica marka dijital kamera ile bilgisayar ortamına aktarıldı. Hücrelerdeki immünreaksiyon şiddeti, iki gözlemci tarafından bağımsız olarak derecelendirildikten sonra ortak skorlar esas alındı. Skorlamada immünperoksidaz ve immünflüoresanla işaretlenmiş preparatlarda x400 mikroskop büyütmesinde en az dört alan değerlendirildi ve ortalamalar esas alınarak skor tablosu oluşturuldu (Tablo 3.2).

Tablo 3.2: İmmünohistokimyasal skora sistemi

Sütür hattı ve ona komşu alandaki fibroblast ve osteoblastlara ait hiç işaretlenme yoksa	(0) ya da (-)
Hücrelerin % 1- 30'unda devamlı işaretlenme varsa	(1) ya da (+)
% 31-60'ında devamlı işaretlenme varsa	(2) ya da (++)
% 61-100'ünde devamlı işaretlenme varsa	(3) ya da (+++)

3.4. İstatistiksel yöntem

Deneklere ait tüm histolojik ve immünohistokimyasal veriler ile makroskopik kalvariyal ölçümlere ait veriler; PC bilgisayarda *SPSS for Windows (release 11.5)* istatistik programı ile değerlendirildi. Buna göre deney ve kontrol grupları arasındaki dağılımın farklılığı, Kruskal Wallis ve onun *posthoc* testiyle değerlendirildi. Histolojik iyileşme sürecinin morfolojik ölçümlerle korelasyonu Spearman testiyle test edildi. Gruplar arası farklılık p değeri 0.05'ten küçük olduğunda anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. MORFOLOJİK ÖLÇÜM DEĞERLERİ

Tüm gruplar için elde edilmiş olan minimum, maksimum değerler ve ortanca değerleri Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1: Tüm gruplar için elde edilmiş morfolojik ölçüm değerleri

ZAMAN	GRUP		Pte – Breg (mm)	Breg-Lambd (mm)	Lambd-Aster (mm)	Aster-Pter (mm)	Nazal uzunluk (mm)	Nazal-Lambd (mm)	Frontal uzunluk (mm)	Skuamozal genişlik (mm)
15. gün	Kontrol	Min.	6,1	5,8	5,9	10,8	9,8	25,5	10,1	14,5
		Maks.	6,6	6,1	6,4	11,4	10,4	26,2	10,6	14,7
		Ort.	6,3	5,9	6,2	11,1	10,1	25,8	10,3	14,5
	İloprost 10 µg/kg/gün	Min.	5,3	4,8	4,9	10,0	8,3	22,7	8,8	13,0
		Maks.	5,7	6,4	5,7	11,0	9,7	24,5	9,8	14,3
		Ort.	5,5	5,6	5,2	10,6	9,1	23,8	9,5	13,6
	İloprost 15 µg/kg/gün	Min.	5,2	5,9	5,5	10,1	8,4	22,0	10,0	13,1
		Maks.	5,9	5,9	5,6	10,6	8,6	23,3	10,2	14,0
		Ort.	5,5	5,5	5,5	10,3	8,5	22,6	10,1	13,5
	İloprost 15 µg/kg/g + Dek.	Min.	5,5	5,5	5,1	8,7	8,0	19,9	8,9	12,7
		Maks.	6,2	5,9	5,9	9,3	8,9	22,4	9,7	13,7
		Ort.	5,9	5,8	5,2	9,0	8,1	21,0	9,1	12,8
30. gün	Kontrol	Min.	5,7	5,7	6,1	11,0	11,4	28,3	11,3	11,7
		Maks.	6,3	7,4	7,5	12,0	13,5	32,7	12,1	14,5
		Ort.	5,9	6,6	6,7	11,5	12,6	30,3	11,7	13,3
	İloprost 10 µg/kg/gün	Min.	5,6	6,3	5,4	10,4	9,1	24,5	9,7	13,9
		Maks.	6,3	7,0	6,6	12,4	12,9	30,5	11,6	15,0
		Ort.	5,8	6,6	5,9	11,1	11,0	27,4	10,7	14,3
	İloprost 15 µg/kg/gün	Min.	5,8	5,4	5,9	11,4	11,3	26,8	11,3	14,3
		Maks.	6,0	5,9	6,3	11,6	11,4	28,3	11,6	14,8
		Ort.	5,9	5,7	6,1	11,5	11,3	27,4	11,4	14,5
	İloprost 15 µg/kg/g + Dek.	Min.	6,0	5,7	6,4	10,0	9,5	23,7	10,0	13,8
		Maks.	6,3	6,4	6,8	10,4	10,3	25,4	10,7	14,6
		Ort.	6,3	6,2	6,6	10,1	9,9	24,6	10,3	14,4
45. gün	Kontrol	Min.	5,8	6,4	6,3	11,7	13,4	31,4	11,9	15,1
		Maks.	6,7	7,3	6,7	12,0	13,6	32,0	12,4	15,8
		Ort.	6,1	6,9	6,5	11,9	13,5	31,7	12,1	15,3
	İloprost 10 µg/kg/gün	Min.	5,8	6,1	5,9	11,1	10,9	28,1	10,3	14,3
		Maks.	6,8	7,1	6,5	11,5	12,3	29,0	12,2	14,9
		Ort.	6,2	6,6	6,1	11,2	11,6	28,5	11,1	14,5
	İloprost 15 µg/kg/gün	Min.	5,9	6,6	6,4	10,3	12,8	30,4	12,3	14,9
		Maks.	6,1	6,9	6,7	12,6	13,3	32,5	12,9	15,1
		Ort.	6,0	6,7	6,5	11,4	13,0	31,4	12,6	15,0
	İloprost 15 µg/kg/g + Dek.	Min.	6,0	6,3	6,4	10,5	12,0	28,2	10,9	14,5
		Maks.	6,8	7,0	6,8	11,4	12,4	28,9	12,0	15,3
		Ort.	6,2	6,5	6,5	11,1	12,1	28,8	11,5	15,0

Deney gruplarından kontrol grubuna göre morfolojik ölçüm değerlerinde anlamlı farklılıklar saptananlar Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2: Morfolojik ölçümlerle istatistiksel olarak anlamlı p değerlerinin saptandığı gruplar altı çizili olarak gösterilmiştir ($p < 0.050$).

	15. gün	30. gün	45. gün
1- Pte – Breg	<u>,014</u>	,072	,301
2- Breg – Lambd	,240	<u>,011</u>	,391
3- Lambd – Aster	<u>,024</u>	<u>,012</u>	<u>,029</u>
4- Aster – Pter	<u>,005</u>	<u>,009</u>	,142
5- Nazal uzunluk	<u>,012</u>	<u>,024</u>	<u>,001</u>
6- Nazal – Lambd	<u>,004</u>	<u>,009</u>	<u>,004</u>
7- Frontal uzunluk	<u>,005</u>	<u>,015</u>	<u>,007</u>
8-Skuamozal genişlik	<u>,010</u>	,595	<u>,006</u>

15. günde: Pte – Breg, Lambd – Aster, nazal uzunluk, nazal – lambda ve skuamozal genişlik ölçümlerinde her üç deney grubunda da kontrol grubuna oranla anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. Aster-Pter ölçümünde yüksek doz prostasiklin ve prostasiklin + deksametazon gruplarında; frontal uzunluk ölçümünde ise düşük doz prostasiklin ve prostasiklin + deksametazon gruplarında kontrol grubuna oranla anlamlı bir azalma bulunmuştur.

30. günde: Lamb-Aster ölçümünde düşük doz prostasiklin grubu; Aster-Pter ölçümünde prostasiklin + deksametazon grubu; Nazal – Lambd ölçümünde yüksek doz prostasiklin ve prostasiklin + deksametazon grubu; Frontal uzunluk ölçümünde her üç grupta; Nazal uzunluk ölçümünde yüksek doz prostasiklin ve prostasiklin + deksametazon grubunda kontrol grubuna oranla anlamlı bir azalma gösterilmiştir.

45. günde: Nazal uzunluk ve skuamozal genişlik ölçümlerinde her üç grupta; nazal – lambda ve frontal uzunluk ölçümlerinde düşük doz prostasiklin ve prostasiklin + deksametazon gruplarında; Lambd - Aster ölçümlerinde düşük doz prostasiklin grubunda kontrol grubuna oranla anlamlı bir azalma bulunmuştur.

4.2. HİSTOLOJİK BULGULAR

4.2.1. Histolojik olarak sütür iyileşmesinin değerlendirilmesi:

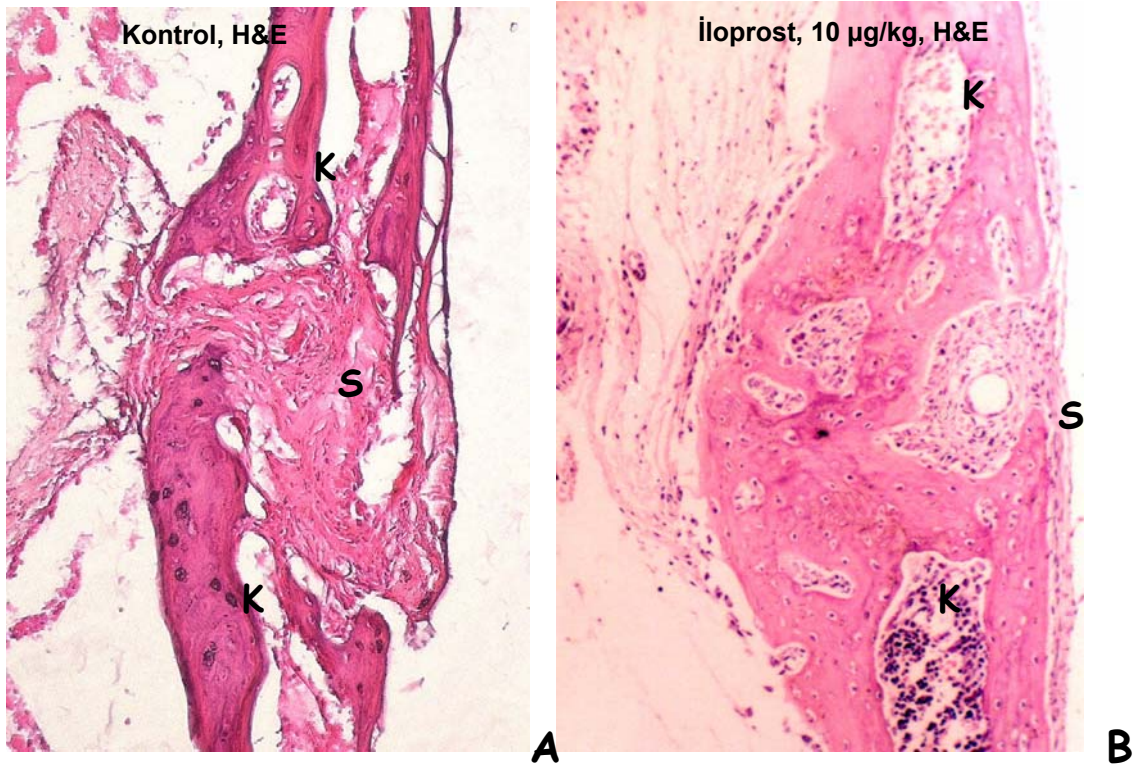
Deney ve kontrol gruplarından, 15, 30 ve 45. günlerde elde edilen doku örnekleri, yöntemde belirtilen kemikleşme kategorileri için skorlandıktan sonra ulaşılan sıra ortalamaları Tablo 4.3'de gösterilmiştir. Deney ve kontrol gruplarının tümünde, sütür bölgesinde membranöz kemikleşme sürecinin; duranın desteği ile endokranial ektokraniyal yönde gerçekleşen çeşitli evreleri gözlemlendi. İzlenen dönemlerde sütür alanında damardan zengin bağ dokusunun organizasyonu ile eş zamanlı olarak, büyüyen sütür kenarındaki kemikte korteks ve spongiyozanın kalınlaşmasıyla birlikte yeniden şekillenmesi ve kemik iliği elemanlarının yeniden yapılanmasına ait bulgular dikkati çekti.

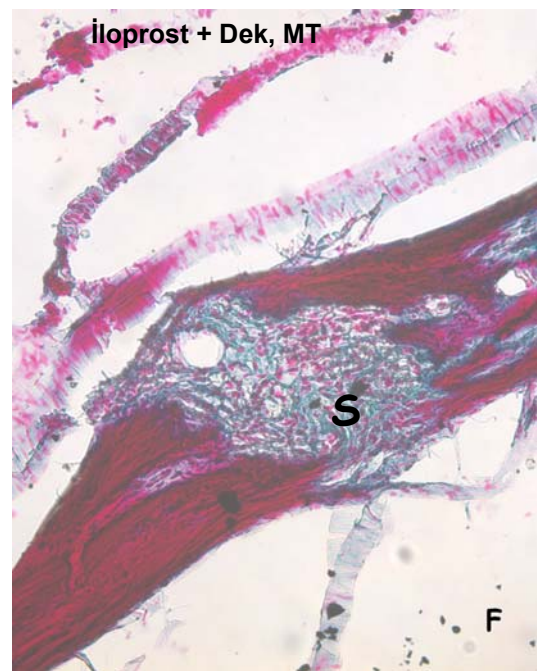
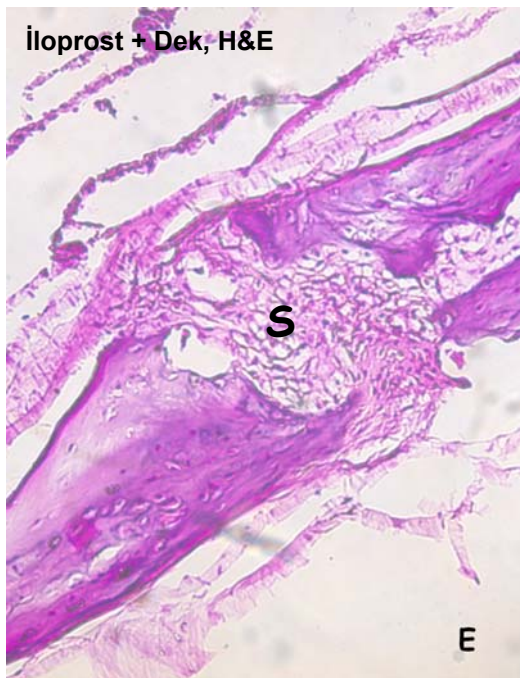
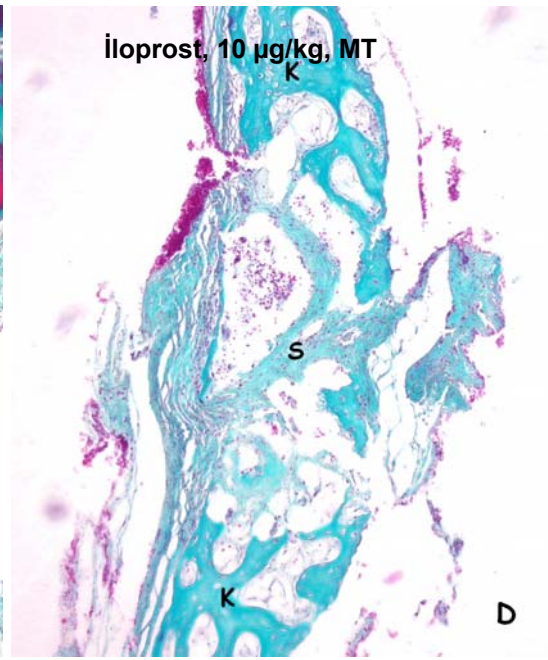
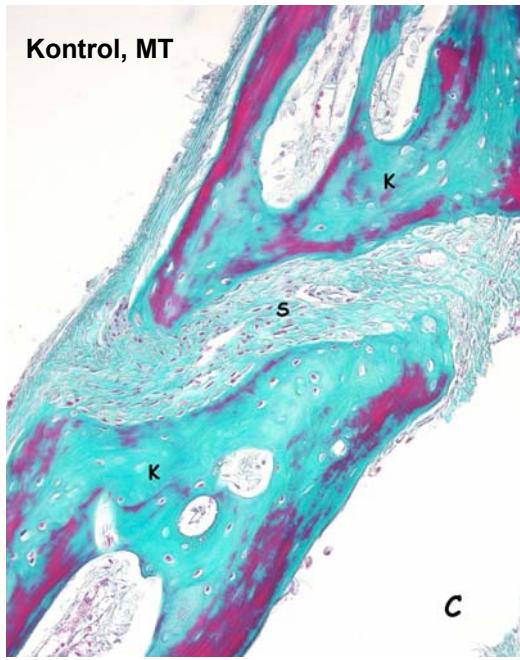
15. gün: Düşük ve yüksek doz iloprost uygulanan gruplarda, sagittal sütür organizasyonunun kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde hızlandığı saptandı ($p < 0.05$, Tablo 4.3). Iloprostun deksametazon ile beraber uygulandığı grupta sütür iyileşmesinin kontrol grubu ile benzer düzeyde olduğu izlendi. Tek başına iloprost ile sütür alanının daraldığı, pek çok denekte kemikleşmeye başladığı; ancak her üç gruba ait örneklerde halen patent olduğu (Şekil 4.1), bununla birlikte sagittal sütür kenarındaki kemiğin anastomozlaşan genç trabeküllerin eklenmesiyle hızla büyümekte ve büyüdükçe hızla yeniden yapılanmakta olduğu dikkati çekti. Masson ve Mallory trikromla boyalı

Tablo 4.3: Gruplarındaki sütür iyileşmesine ait histolojik değerlendirme sonuçları görülmektedir. (Fr: frontal, Sa: sagittal, Min: minimum, Maks: maksimum, Ort: ortanca)

Süre	Grup		H&E ve MT		
			Min.	Maks.	Ort.
15 gün	Kontrol	Fr	3	5	4,00
		Sa	0	3	1,50
	İloprost 10µg/kg/gün	Fr	4	7	6,00
		Sa	2	5	3,00
	İloprost 15µg/kg/gün	Fr	6	7	6,50
		Sa	4	6	4,50
	İloprost 15µg/kg/gün + Deksametazon	Fr	3	5	4,00
		Sa	1	3	2,00
30 gün	Kontrol	Fr	7	8	7,50
		Sa	1	5	2,00
	İloprost 10 µg/kg/gün	Fr	6	8	7,00
		Sa	3	7	4,00
	İloprost 15 µg/kg/gün	Fr	7	8	8,00
		Sa	6	7	6,00
	İloprost 15µg/kg/gün + Deksametazon	Fr	6	8	7,00
		Sa	1	4	2,50
45 gün	Kontrol	Fr	7	9	8,00
		Sa	3	4	3,50
	İloprost 10 µg/kg/gün	Fr	7	9	8,00
		Sa	3	6	5,50
	İloprost 15 µg/kg/gün	Fr	6	8	7,00
		Sa	6	7	6,00
	İloprost 15µg/kg/gün + Deksametazon	Fr	7	8	8,00
		Sa	3	4	3,00

Şekil 4.1: Onbeşinci günde sagittal sütürden alınan örnekler. Kontrol örneklerindeki (A, C) fibröz sütür hattı iloprost-deksametazon grubuyla (E, F) benzer kalınlıkta; tek başına iloprost uygulanan gruplara (B, D) göre daha az aktif kemik kenarlarla çevrili olarak izlenmektedir. İloprost verilenlerde (B, D) daralmış sütür hattını çepeçevre sarmış anastomozlaşan kemik trabekülleri ve ilik bileşenlerinin reorganize olduğu alanlar görülmektedir. (H&E: Hematoksilen eozin, MT: Mallory trikrom, Dek: Deksametazon, S: Sütür, K: Kemik) X 200.





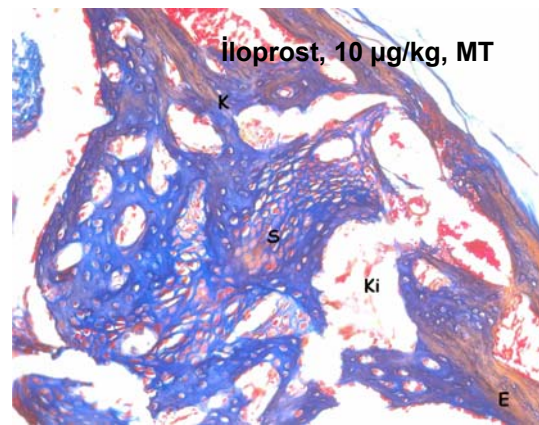
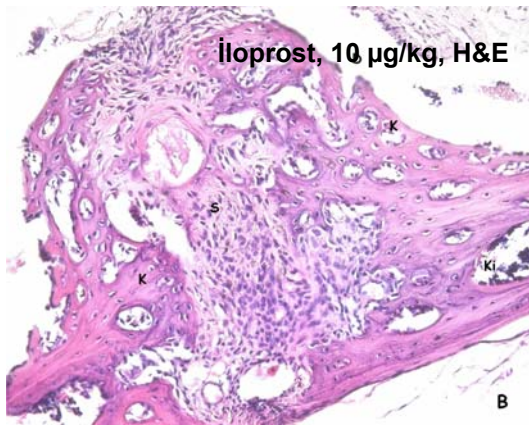
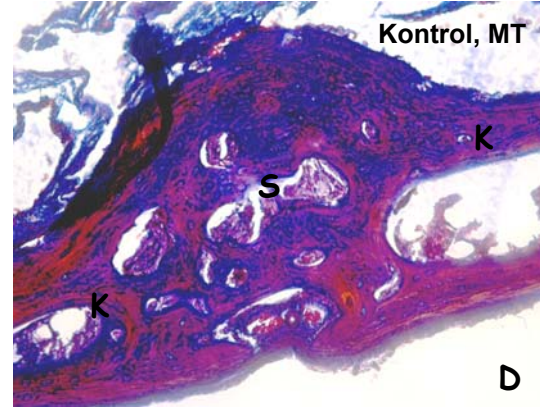
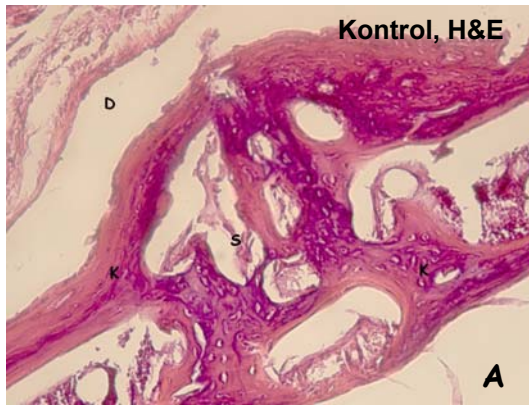
preparatlarda yeşil / mavi gözükten, yeni yapılanmakta olan kemikteki kollagen dizilimini sağlayan ekstraselüler matriks yapısı belirgin olarak saptandı. Trabeküllerin yüzeyinde yeni matriksi sentezleyen aktif osteoblastların varlığı dikkati çekti. Trabeküllerin arasında kemik iliğini şekillendirecek olan hücresel elemanların damarlarla yakın komşulukta oldukları izlendi. İloprost - deksametazon grubunda, kontrol grubu ile benzer biçimde sütür hattındaki trabeküller ve komşu ilik bileşenlerinin yapılanmasının geciktiği izlendi.

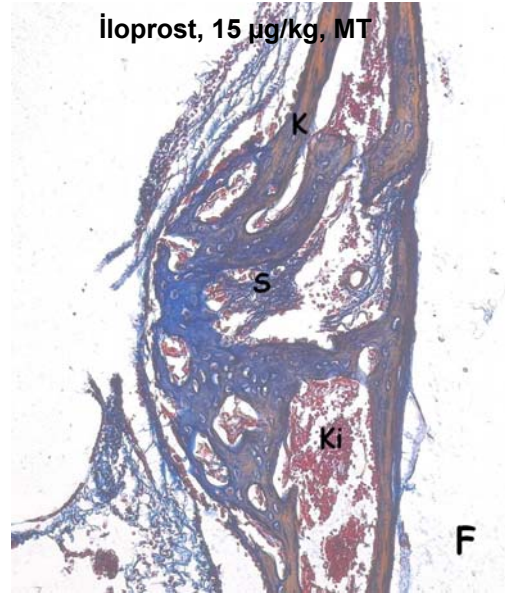
Frontal sütürün, deney ve kontrol gruplarına ait örneklerde sagittal sütüre göre kemikleşme sürecinde daha ileri evrede olduğu saptandı (Şekil 4.2). Kemiğin yeniden yapılanmasının tek başına iloprost uygulanan gruplarda, iloprost-deksametazon ve kontrol gruplarına göre daha iyi olduğu gözlemlendi. Frontal sütür iyileşmesine ait skorların sıra ortalamaları Tablo 4.3'de verilmektedir.

30 ve 45. gün: Tek başına iloprost uygulanan her iki grupta, sagittal sütür organizasyonunun kontrol grubuna göre ikinci haftaya benzer biçimde istatistiksel olarak anlamlı şekilde hızlandığı saptandı ($p < 0.05$, Tablo 4.3, Şekil 4.3, 4.4). İloprost-deksametazon grubuna ait skorlar kontrol grubunkilerle anlamlı bir farklılık göstermedi. Altıncı haftada düşük ve yüksek doz iloprost uygulanan gruptaki deneklerin bir çoğunda sütürün patent olduğu izlendiyse de; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, bu grup kortikal kemiğin yeniden yapılanması, yeni ilik elemanlarının şekillenmesi açısından daha yüksek skorlar aldı. Deney grubunda komşu kemik uçlarının birbirine dil biçiminde, dallanmış kemik trabekülleri ile yaklaşmasıyla sütür

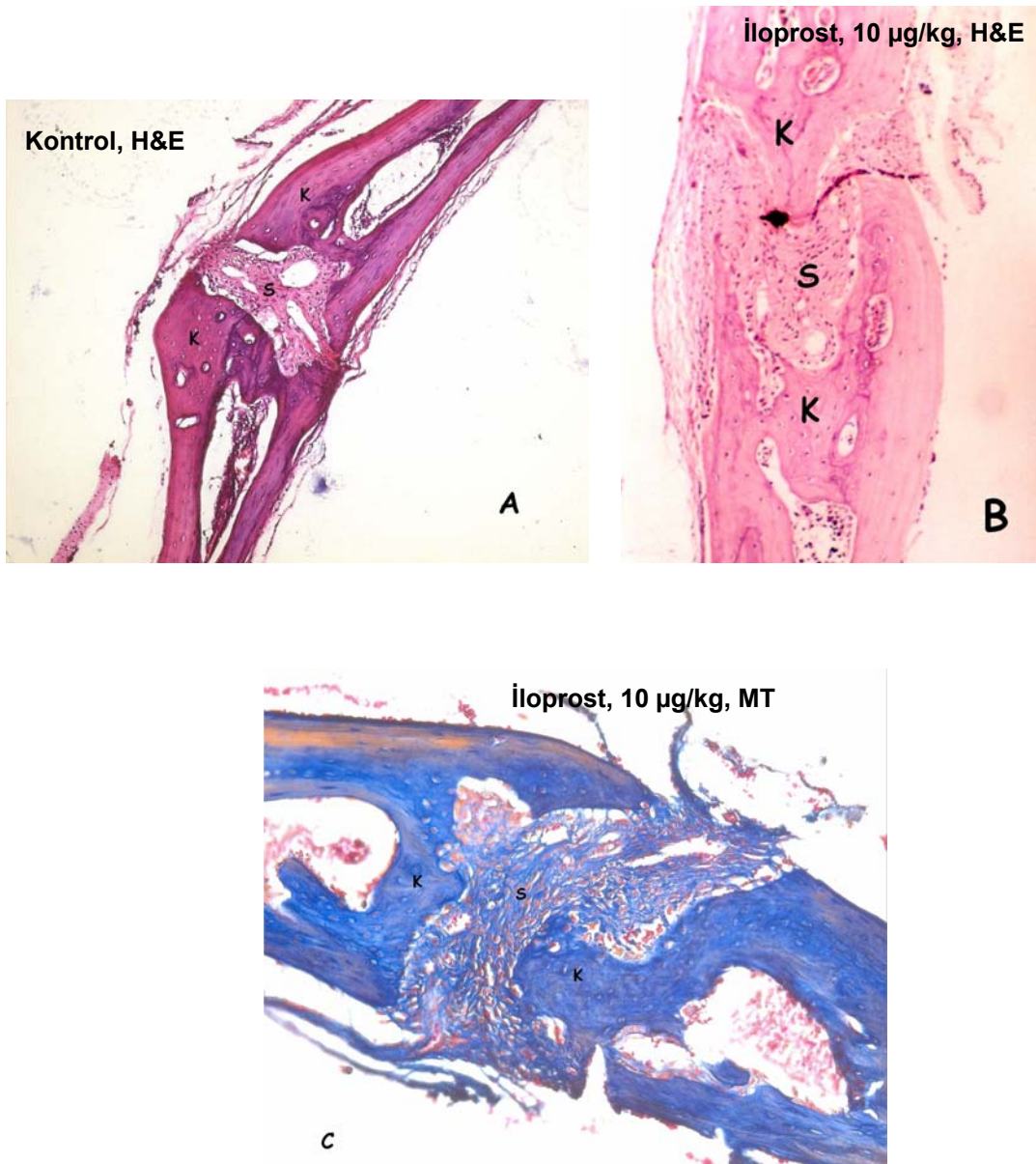
alanının daralarak ileri derecede düzensizleştiği izlendi. Sütür alanındaki bağ dokusunun deney grubunda kontrol grubuna göre damar ve hücreden çok daha zengin görünümde olduğu, damarların çoğunlukla merkezi yerleşimli oldukları dikkati çekti. Genç kemik trabeküllerin yüzeylerinde deney grubunda rezorpsiyondan sorumlu osteoklastlar sıkça görülmekte idi. Otuzuncu günden itibaren deney ve kontrol gruplarına ait örneklerin hemen tümünde frontal sütürde fizyolojik iyileşme sürecini izleyen biçimde tam kemik köprüsünün oluştuğu izlendi (Şekil 4.5, 4.6). Otuzuncu günde tek başına iloprost uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre sütüre komşu bölgelerde kemik ve kemik iliğinin orijinal biçimine daha hızla kavuşmakta olduğu dikkati çekti. İloprost-deksametazon grubunda ilik yapılanması iloprost gruplarına göre geri, kontrol grubuna benzer şekildeydi.

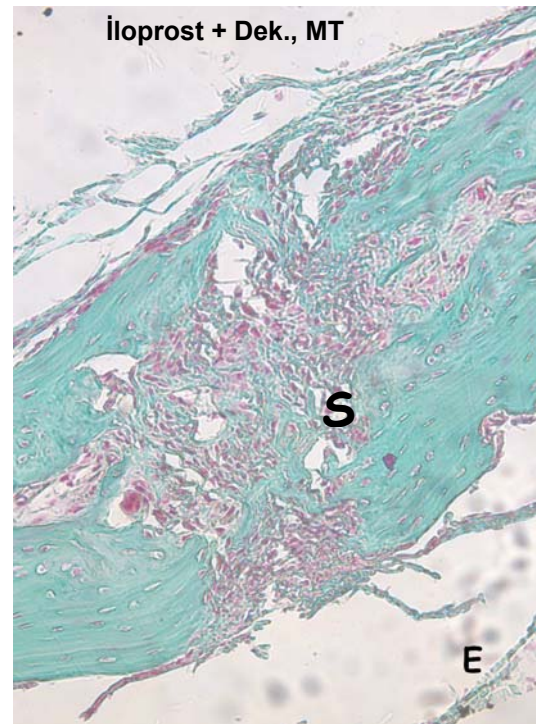
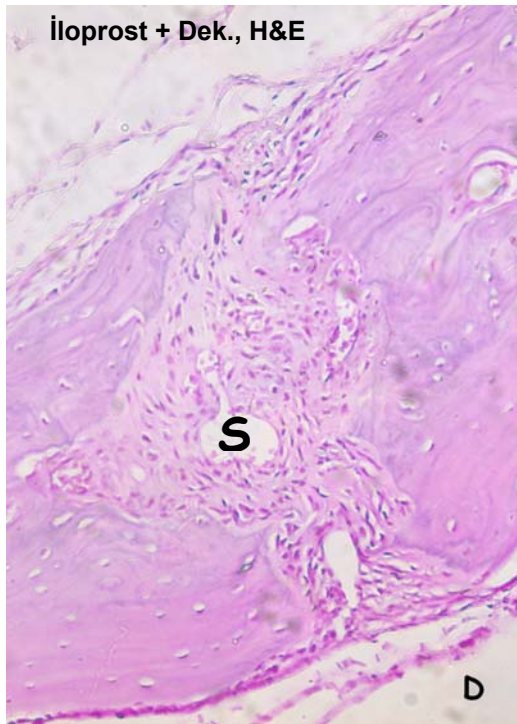
Şekil 4.2: Onbeşinci günde frontal suture ait kontrol (A, D), düşük doz iloprost (B, E) ve yüksek doz iloprost (C, F) ve iloprost-deksametazon (G, H) grubu örnekleri. Trabeküller arasında yapılanmakta olan ilik boşluklarına dikkat ediniz. Suturen endokraniyal yarısının kemikleştiği görülmektedir. (H&E: Hematoksilen eozin, MT: Mallory trikrom, D: Deksametazon, S: suture, K: kemik, D: dura, P: periost, Ki: kemik iliği) X 200



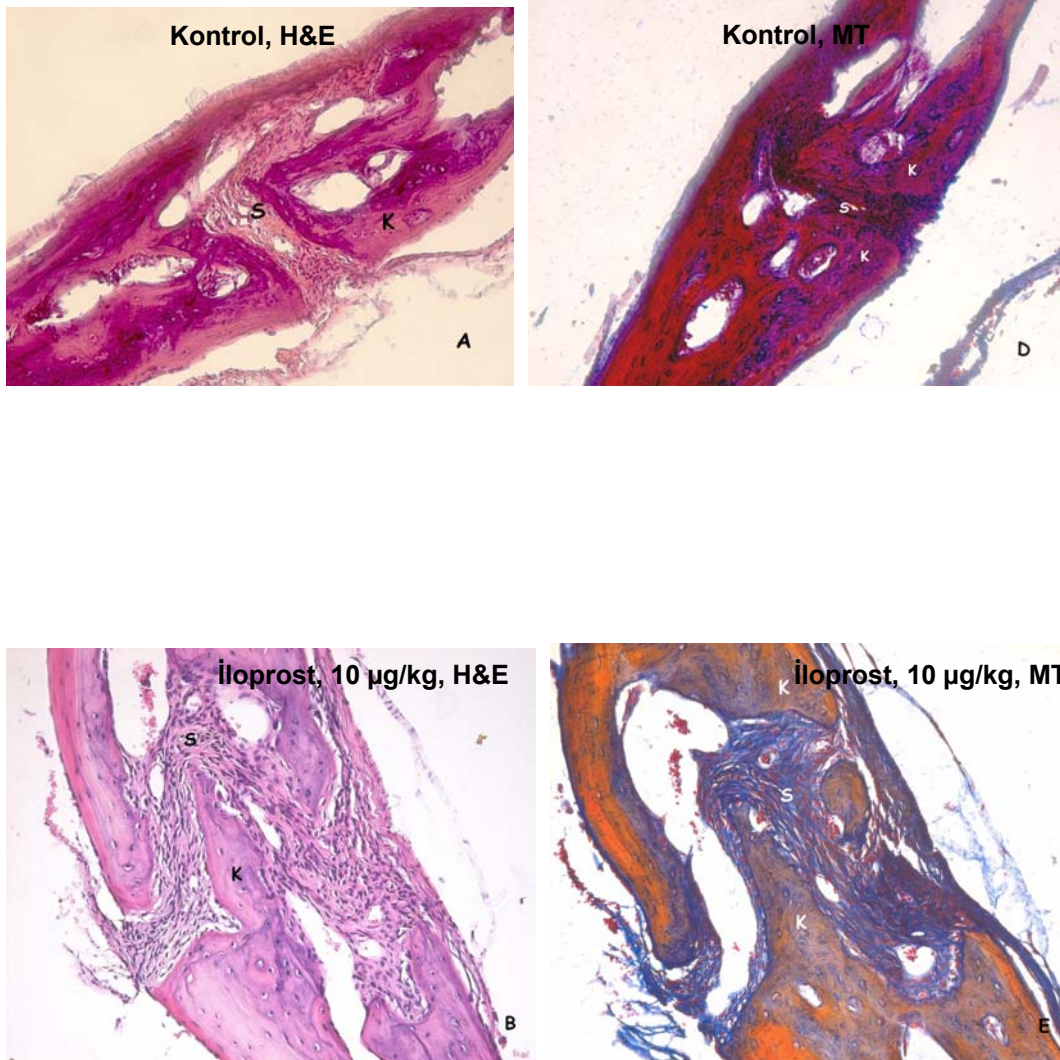


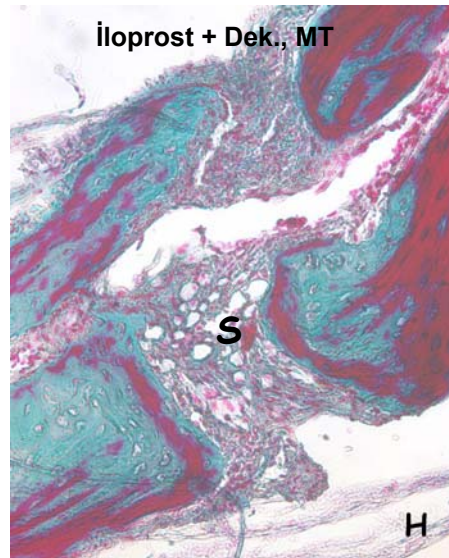
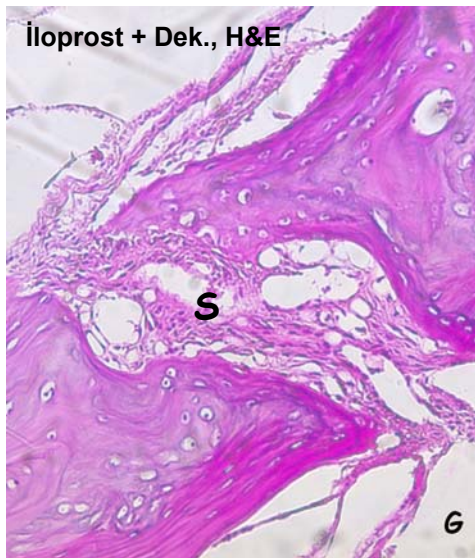
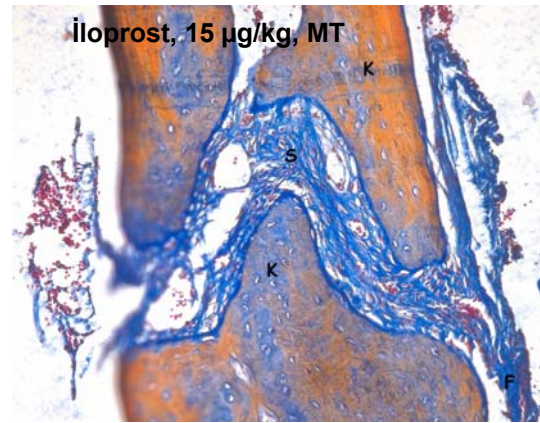
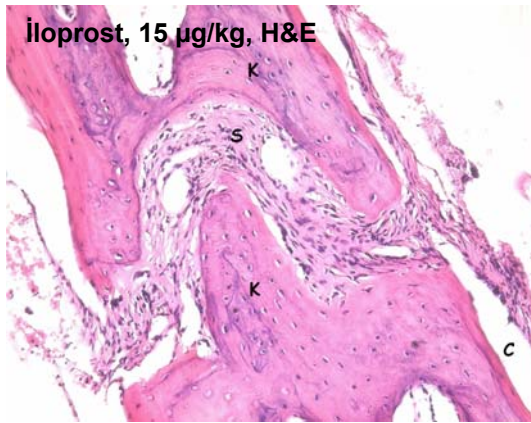
Şekil 4.3: Otuzuncu gün sagital suture ait kontrol (A), iloprost (B, C) ve iloprost-deksametazon (D, E) grubu örnekleri. İloprost gruplarında tümüyle yeniden yapılanan olgun çevre kemik çatı ve kemik iliğinin varlığına rağmen, daralmış suture hattının halen patent olduğu; ancak kemik trabeküllerinin fibröz suture hattına doğru çıkıntı yaptığı dikkati çekmektedir. Kontrol ve iloprost-deksametazon grubunda suture hattı komşuluğundaki kemik ve ilik bileşenlerinin yeniden yapılanması iloprost grubuna göre geri evrededir. (A, B: Hematoksilen eozin, C: Mallory trikrom, Dek: Deksametazon, S: suture, K: kemik) X 200.



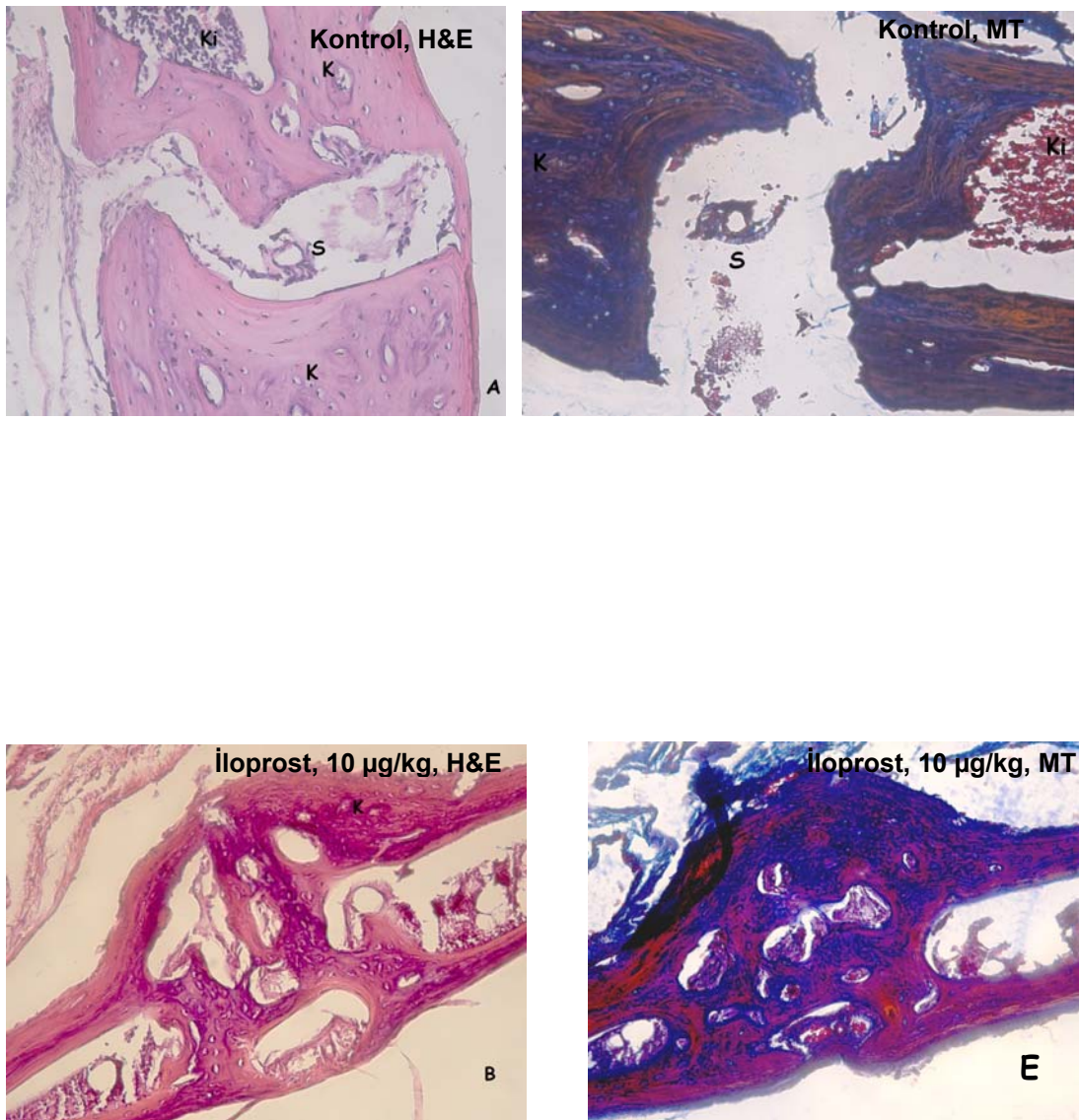


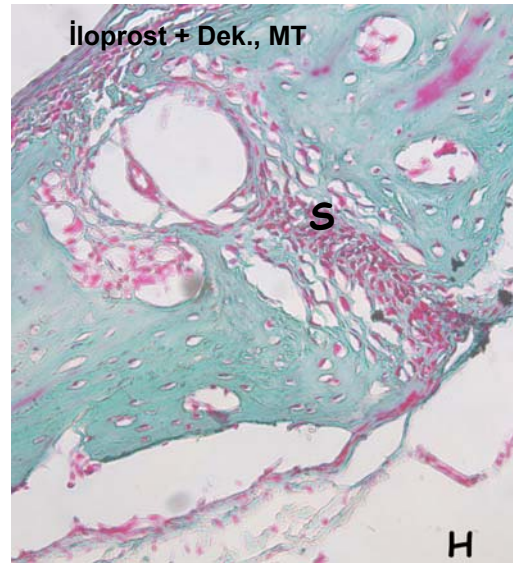
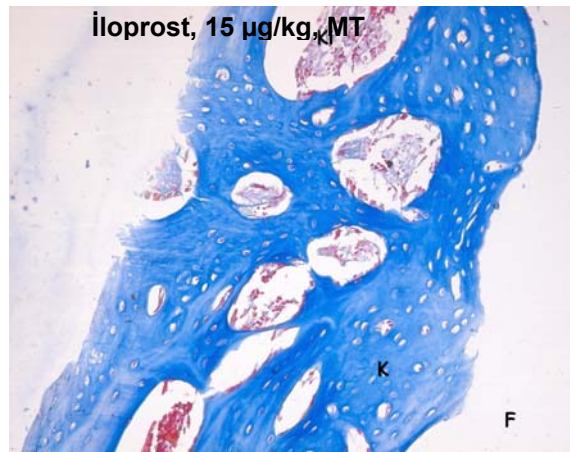
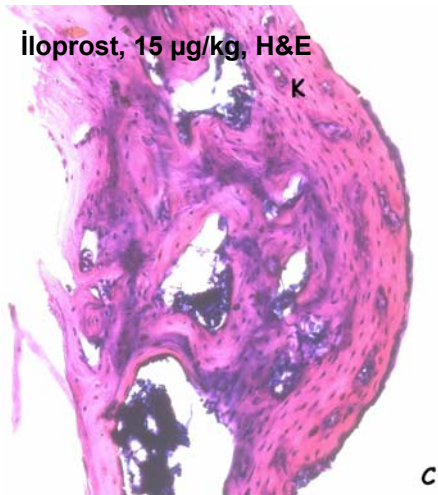
Şekil 4.4: Kırk beşinci günde sagittal suture ait kontrol (A, D), düşük doz iloprost (B, E), yüksek doz iloprost (C, F) ve iloprost-deksametazon (G, H) grubu örnekleri. Tüm gruplarda hala dar bir bölgede patent sagittal suture izlenmektedir. İloprost uygulanan gruplara ait görüntülerde iyice daralmış suture hattındaki belirgin kemik girintisine dikkat ediniz. İloprost-deksametazon grubu ise kontrol ile benzer, hatta daha geri evrede izlenmektedir. Bu gruplarda suture hattı oldukça geniştir. (H&E: Hematoksilen eozin, MT: Mallory trikrom, Dek: Deksametazon, S: suture, K: kemik, Ki: kemik iliği) X 200.



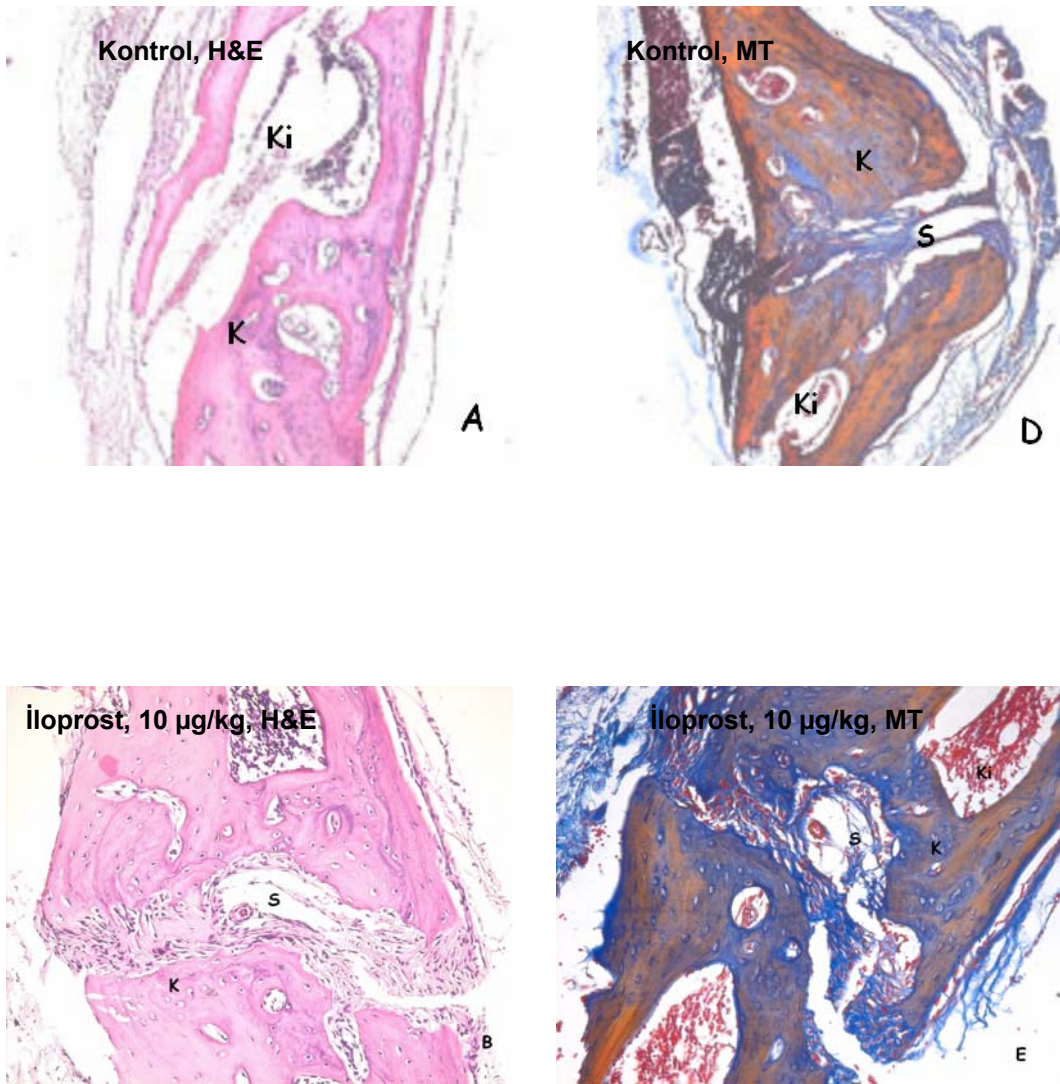


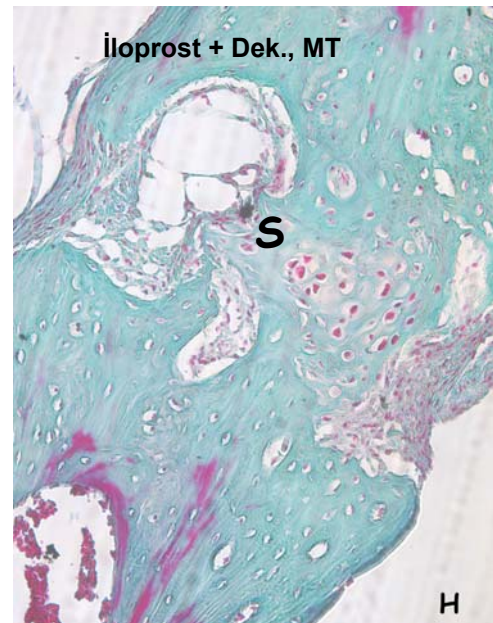
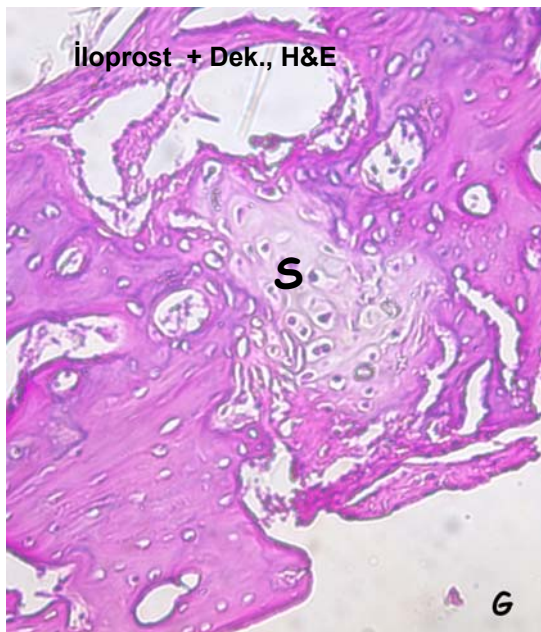
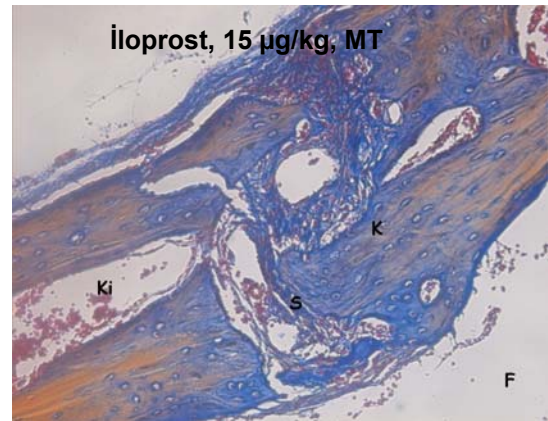
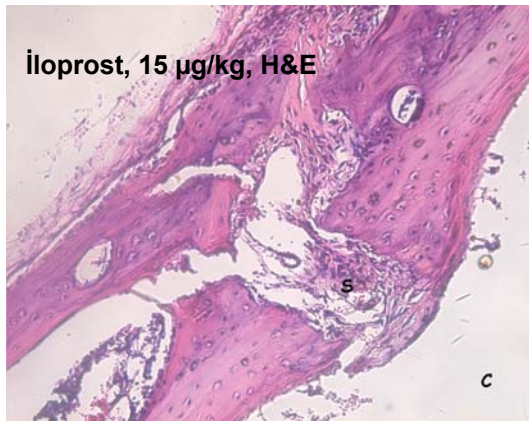
Şekil 4.5: Otuzuncu günde frontal suture ait kontrol (A, D), düşük doz (B, E), yüksek doz (C, F) iloprost ve iloprost-deksametazon (G, H) uygulanan doku örnekleri. İloprost gruplarına ait kesitlerde suture hattının tümüyle kemikleştiği ve kemik ile ilik bileşenlerinin yeniden yapılanmış olduğu görülmektedir. İloprost- deksametazon grubunda suture halen patent, iyileşme kontrolden daha geri evrededir. (H&E: Hematoksilen eozin, MT: Mallory trikrom, Dek: Deksametazon, S: suture, K: kemik, Ki: kemik iliği) X 200.





Şekil 4.6: Kırk beşinci günde frontal suture ait kontrol (A, D), düşük doz (B, E), yüksek doz (C, F) iloprost ve iloprost-deksametazon (G, H) uygulanan gruplara ait kesitler. Kollagen dizilimi olgun kemiğe uygun kırmızı renkli kortikal, genç mavi spongiyöz kemik ve içindeki olgun ilik bileşenleri iloprost ve iloprost-deksametazon gruplarında hala dar bir bölgede patent frontal sutürü çevrelemiştir. İlik ve kemik yeniden yapılanması iloprost grubunda, kontrol ve iloprost-deksametazon uygulanan gruba göre daha ileri evrededir. (H&E: Hematoksilen eozin, MT: Mallory trikrom, Dek: Deksametazon, S: suture, K: kemik, Ki: kemik iliği). X 200





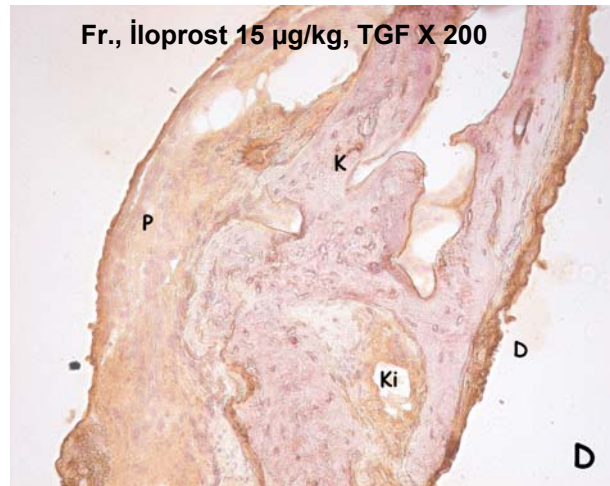
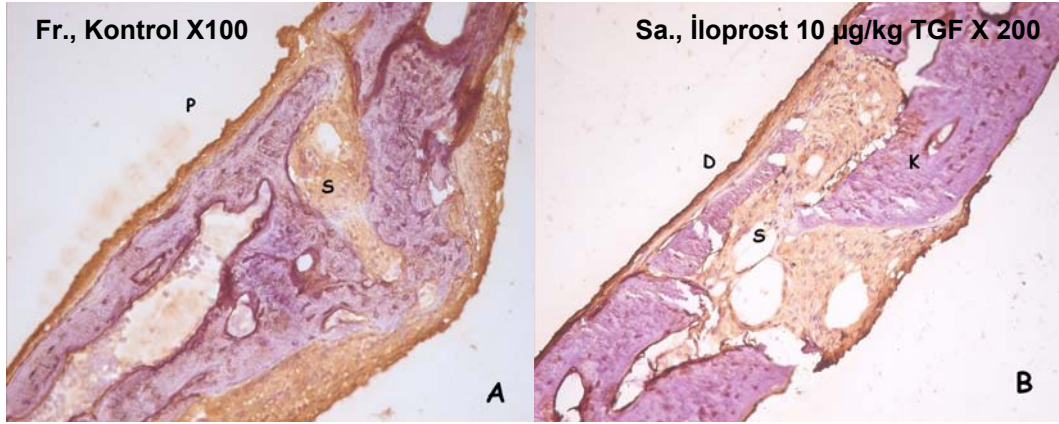
4.2.2. TGF- β 1 ve FGF-2 'nin immünohistolojik işaretlenmesinin değerlendirilmesi:

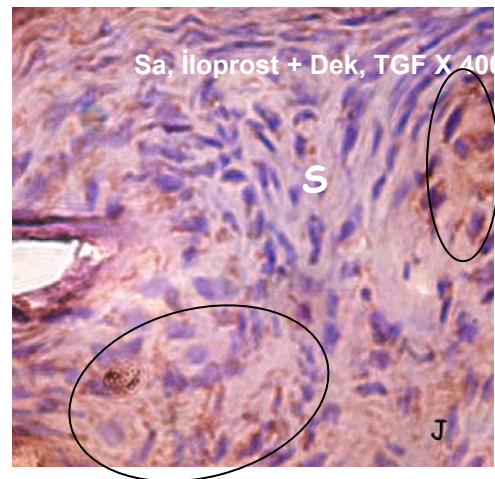
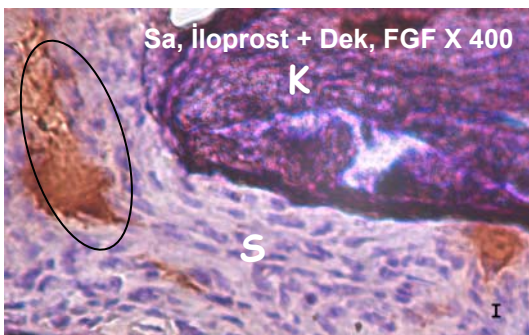
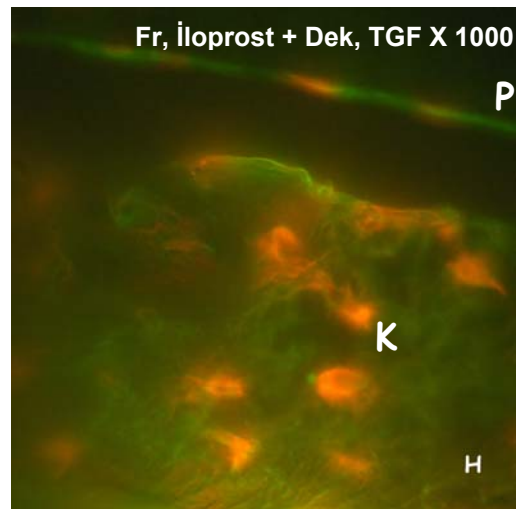
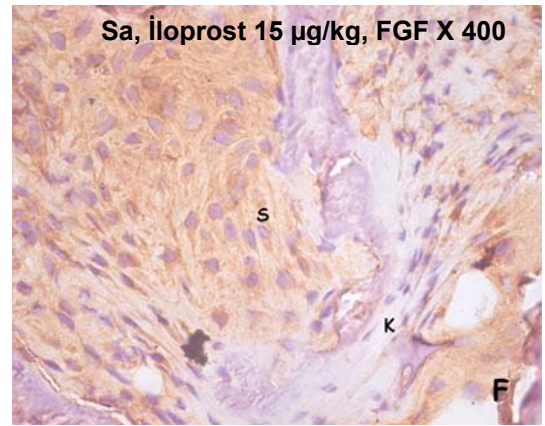
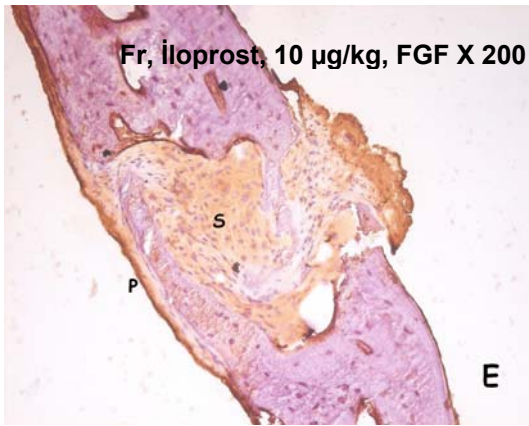
Sütür alanında ve onun sınırındaki TGF- β 1 ve FGF-2 eksprese eden fibroblastlar ile osteoblastlar topluca sayıldıktan sonra elde edilen veriler ve bunlara ait tanımsal istatistiksel bilgiler Tablo 4.4'de verilmiştir. Sütür alanında, durada mezenkimal bağ dokusunda ve yeni kemiğe komşu fibroblastlar / mezankimal hücreler ile kemik matriksi sentezlemekte olan osteoblastların sitoplazmalarında TGF- β 1 ve FGF-2 işaretlenmesi gösterildi (Şekil 4.7). TGF- β 1 ve FGF-2 ekspresyonu, incelenen zaman dilimlerinde kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermedi. Bununla birlikte deney ve kontrol gruplarında frontal sütür bölgesinde sütürün aktif kemikleşme sürecinde olduğu onbeşinci günde; sagittal sütürde ise aktif sürecin devam ettiği on beş ve otuzuncu günlerde FGF-2 ve daha belirgin olarak da TGF- β 1 ekspresyonunun; bağ dokusundaki fibroblastlar ve yeni kemik matriksini sentezlemekte olan osteoblast gruplarında arttığı izlendi (Şekil 4.7, 4.8). Frontal sütürün tamamen kemikleştiği otuz ve kırkbeşinci günlerde tüm gruplarda TGF- β 1 ve FGF-2 ekspresyonunun lakünelardaki osteositlere kaydığı ve giderek azaldığı saptandı. Sagittal sütür bölgesindeki TGF- β 1 ekspresyonu tüm zaman dilimlerinde tek başına prostaglandin uygulanan gruplarda doz bağımlı olarak kontrol grubuna göre özellikle endokraniyel

Tablo 4.4: Deney ve kontrol gruplarında sütür hattında ve onun sınırında yerleşik fibroblastlar ve osteoblastlara ait immünohistolojik işaretlenme değerleri. (Fr: Frontal, Sa: Sagital, Min: Minimum, Maks: Maksimum, Ort: Ortanca)

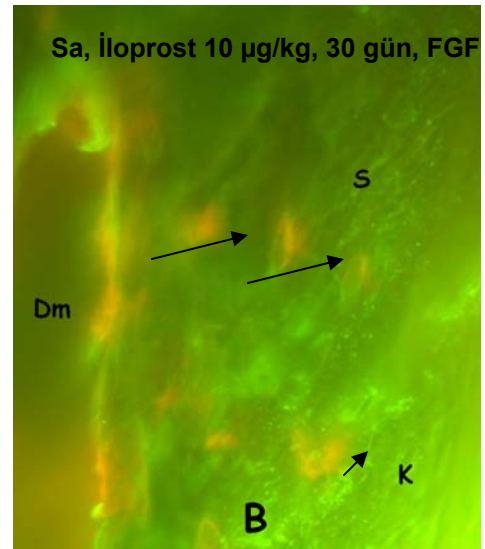
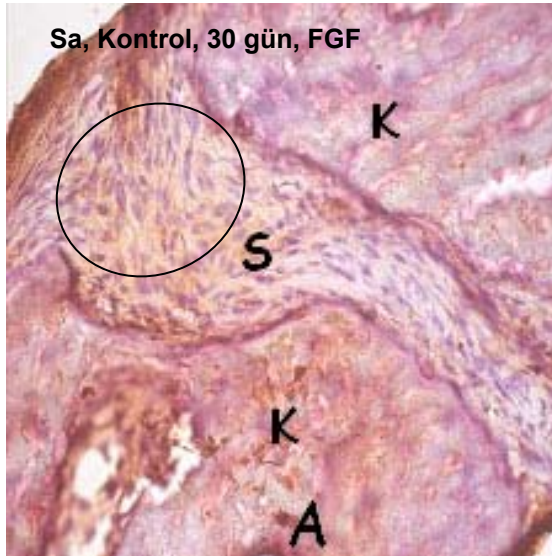
Süre	Grup		TGF İmmün reaktivitesi			FGF İmmün reaktivitesi		
			Min.	Maks.	Ort.	Min.	Maks.	Ort.
15 gün	Kontrol	Fr	3	3	3,00	3	3	3,00
		Sa	1	2	1,50	1	2	1,00
	İloprost 10µg/kg/gün	Fr	3	3	3,00	2	3	2,50
		Sa	1	2	2,00	2	3	2,00
	İloprost 15µg/kg/gün	Fr	2	3	2,00	2	3	2,00
		Sa	1	2	2,00	1	2	1,50
	İloprost 15µg/kg/gün + Deksametazon	Fr	2	3	3,00	2	3	3,00
		Sa	1	2	2,00	1	2	2,00
30 gün	Kontrol	Fr	1	1	1,00	0	1	0,50
		Sa	1	2	1,50	0	1	1,00
	İloprost 10 µg/kg/gün	Fr	0	2	1,00	0	1	1,00
		Sa	0	3	2,00	0	2	1,00
	İloprost 15 µg/kg/gün	Fr	0	1	1,00	0	1	0,00
		Sa	1	2	1,50	1	2	1,50
	İloprost 15µg/kg/gün + Deksametazon	Fr	1	1	1,00	0	1	1,00
		Sa	1	2	1,00	0	1	1,00
45 gün	Kontrol	Fr	0	1	0,00	0	1	0,00
		Sa	1	1	1,00	0	1	0,50
	İloprost 10 µg/kg/gün	Fr	0	1	0,50	0	1	0,00
		Sa	1	2	1,00	0	1	1,00
	İloprost 15 µg/kg/gün	Fr	0	1	0,00	0	1	0,00
		Sa	1	2	2,00	1	2	1,50
	İloprost 15µg/kg/gün + Deksametazon	Fr	0	1	0,00	0	1	1,00
		Sa	0	2	1,00	0	2	1,00

Şekil 4.7: Onbeşinci günde frontal (A, C, D, E, G, H) ve sagittal (B, F, I, J) sütünün indirekt immünperoksidaz (A, B, D, E, F, I, J) ve immünflüoresan (C, G, H) yöntemle işaretlenmiş doku kesitlerinde TGF ve FGF ekspresyonu sırasıyla turuncu / kahverengi veya yeşil renkte izlenmektedir. (A, B, G, J): Patent sütün hattındaki mezansimal hücrelere ek olarak yeni oluşmuş osteoid matrikste yerleşik osteositlerde (C, ok) TGF için pozitif immünreaksiyon görülmektedir. (D, E, F, H, I): Epikraniyal yerleşimli bağ dokusu içinde ve yeni kemik yüzeyindeki osteojenik potansiyele sahip mezansimal hücrelerde yaygın FGF immün işaretlenmesi izlenmektedir. (P: periost, S: sütün, K: kemik, Ki: kemik iliği, Fr: frontal, Sa: sagittal) Pozitif immünreaktivite gösteren alanlar yuvarlak içine alınmıştır.

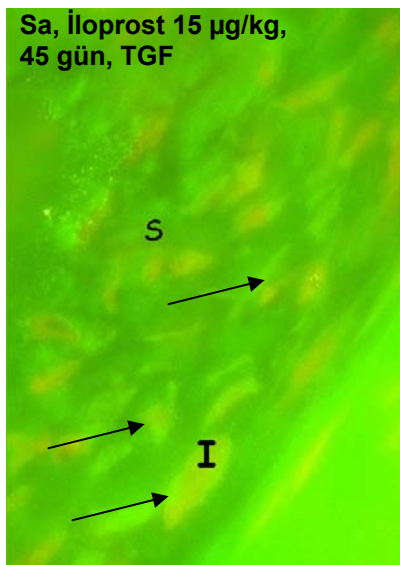
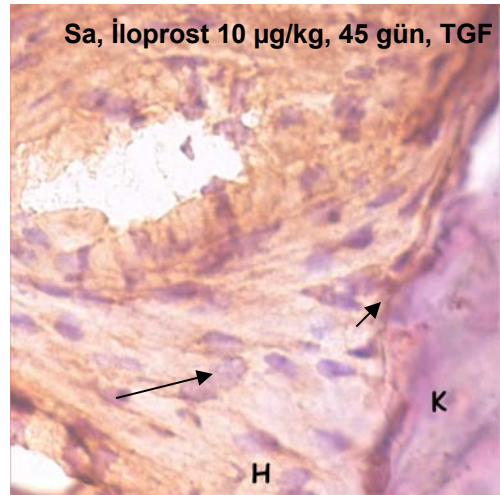
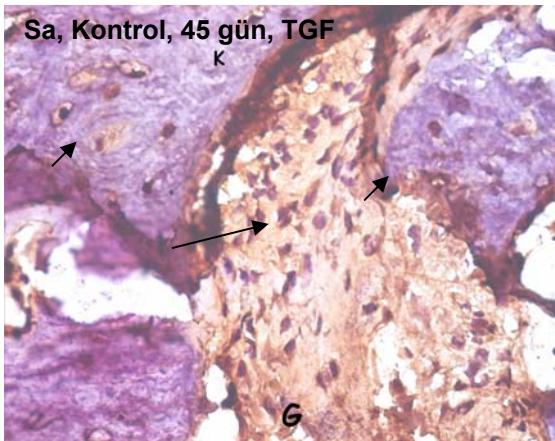
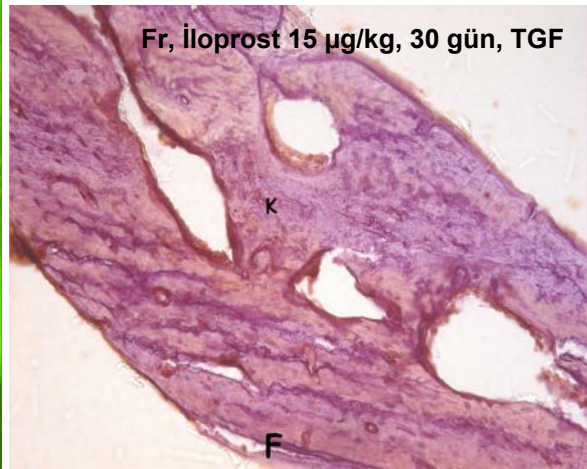
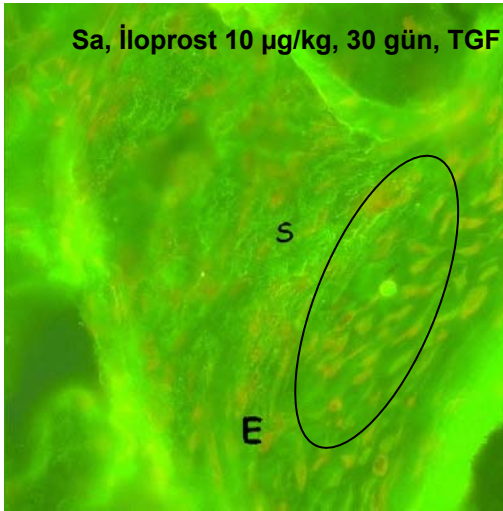


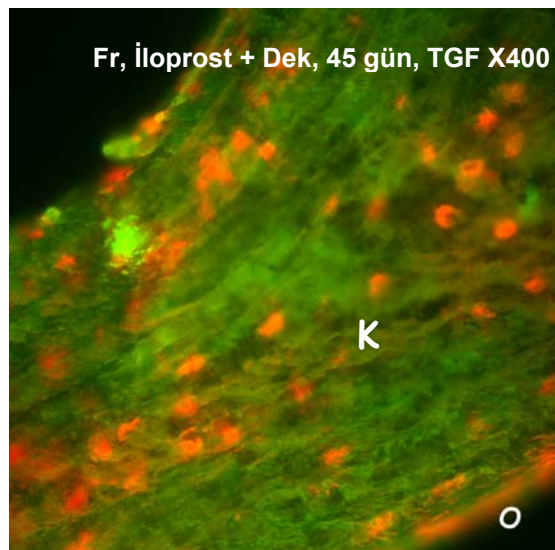
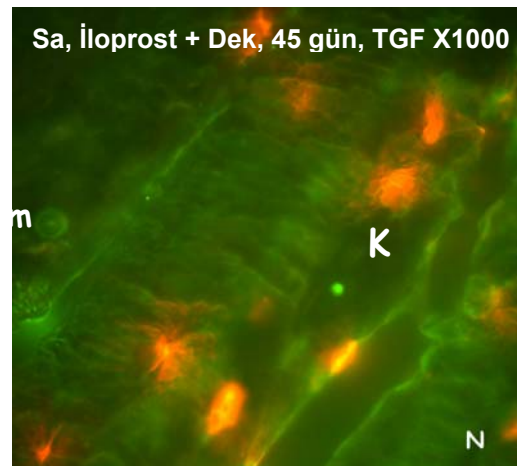
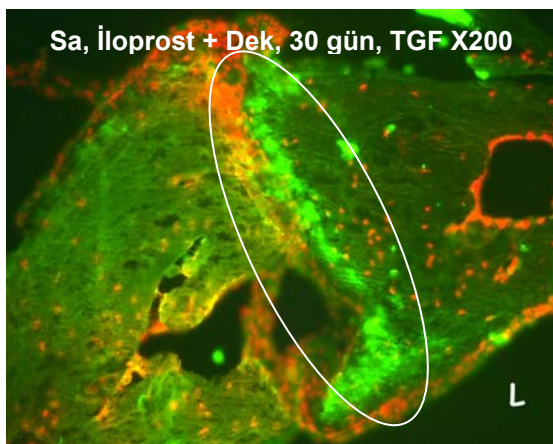
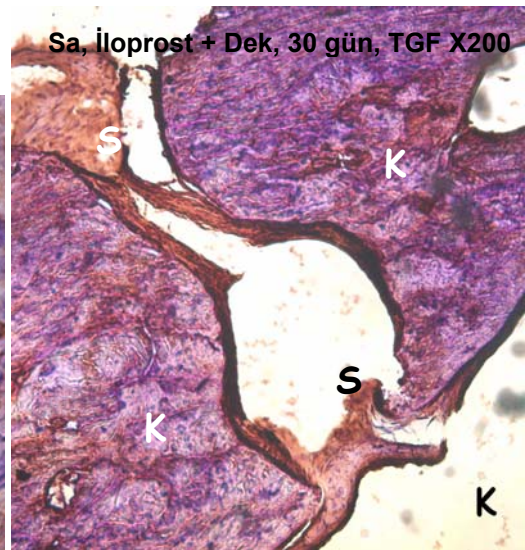
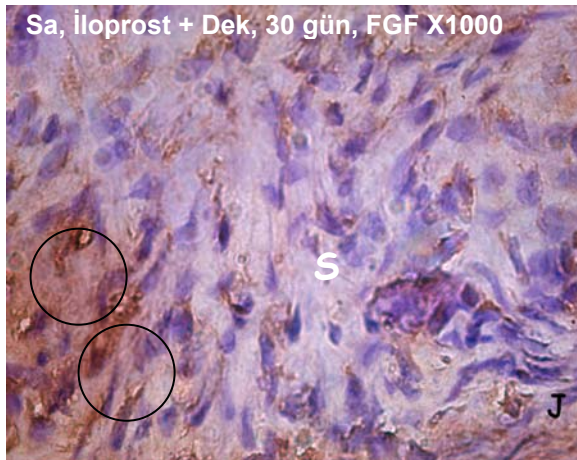


Şekil 4.8: Otuz (A, B, E, F, J, K, L) ve kırkbeşinci günde (C, D, G, H, I, M, O) kontrol ve deney gruplarına ait mikrograflarda TGF ve FGF immünreaktivitesi izlenmektedir. Otuzuncu ve 45. günde günde fibröz sütür hattında damar komşuluğundaki FGF ile immün reaksiyon gösteren mezanşimal hücreler uzun oklarla; kemik çeperindeki osteoblastlar kısa oklarla gösterilmiştir (B). Epikraniyal yerleşimli fibröz bağ dokusu içinde aktif olarak yeni kemik matrisinin salgılanacağı alanda, osteojenik potansiyele sahip bir grup mezenşimal hücredeki TGF/FGF ekspresyonu fluoresan ya da immünperoksidazla işaretli olarak (A: oval çerçevelerin içinde, E, J, K, L) izlenmektedir. (S: Sütür, K: Kemik, Ki: Kemik iliği, Dm: Damar, uzun ok: sütür hattındaki mezenşimal hücreler, kısa ok: osteoblastlar ya da osteositler) Pozitif immünreaktivite gösteren hücrelerin bulunduğu alanlar daire içine alınmıştır.



(Devamı arka sayfada)





yüzde ve fibröz sütün-yeni kemik ara yüzündeki matriks sentezleyen hücrelerde daha belirgin olarak eksprese oldu. Ancak TGF- β 1 ve FGF-2 ekspresyon paterni, ilerleyen zaman dilimlerinde olasılıkla sütün kapanma süreci tamamlanmadığından; genellikle sabit düzeylerde seyretti ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermedi. Iloprost-deksametazon uygulanan grupta FGF ve TGF ekspresyon skorları tek başına iloprost uygulanan gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan derecelerde daha düşük ve bazı gruplarda da eşit olarak saptandı.

4.3. Histolojik sütün iyileşmesinin morfolojik ölçümlerle korelasyonunun değerlendirilmesi

On beşinci günde 10 μ g / kg / gün iloprost uygulanan grupta Lambda - aster ölçümü ile frontal sütün histolojik iyileşme süreci arasında negatif yönde anlamlı bir korelasyon saptandı ($r=-1,0$ $p=0,00$).

Kırk beşinci günde iloprost + deksametazon uygulanan grupta Lambda - aster ölçümü ile sagittal sütün histolojik iyileşme süreci arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon saptandı ($r=0.88$ $p=0,44$).

Kırk beşinci günde iloprost + deksametazon uygulanan grupta Aster – Pter ölçümü ile sagittal sütün histolojik iyileşme süreci arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon saptandı ($r=0.88$ $p=0,44$).

4.4. İmmünohistolojik TGF- β 1 ve FGF-2 işaretlenmesinin morfolojik ölçümlerle korelasyonunun değerlendirilmesi

On beşinci günde iloprost + deksametazon uygulanan grupta Lambda - aster ölçümü ile sagittal sütündeki FGF ekspresyonu arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon saptandı ($r=0.9$ $p=0,03$).

Otuzuncu günde 15 µg / kg / gün iloprost uygulanan grupta Pter - breg ölçümü ile sagittal sütürdeki TGF-β1 ekspresyonu arasında % 100 negatif korelasyon saptandı ($r=-1,0$ $p=0,00$).

Kırkbeşinci günde 10 µg / kg / gün iloprost uygulanan grupta Aster - pter ölçümü ile sagittal sütürdeki FGF-2 ekspresyonu arasında % 85 pozitif yönde önemli bir korelasyon saptandı ($r= 0,853$ $p=0,031$).

Kırkbeşinci günde 10 µg / kg / gün iloprost uygulanan grupta Nazal - lambda ölçümü ile sagittal sütürdeki TGF-β1 ekspresyonu arasında % 84 negatif yönde önemli bir korelasyon saptandı ($r= -0,840$ $p=0,036$).

Kırkbeşinci günde 10 µg / kg / gün iloprost uygulanan grupta frontal uzunluk ölçümü ile sagittal sütürdeki FGF-2 ekspresyonu arasında % 84 oranında negatif yönde önemli bir korelasyon saptandı ($r= -0,840$ $p=0,036$).

Kırk beşinci günde iloprost + deksametazon uygulanan grupta Aster - pter ölçümü ile sagittal sütürdeki FGF-2 ekspresyonu arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon saptandı ($r=0.88$ $p=0,44$).

5. TARTIŞMA

Fetal kraniumda, intramembranöz kemikleşme kemiklerin merkezinden periferine doğru radyal şekilde ilerler ve osteojenik kenarlar zaman içinde birbirlerine yaklaşır. Osteojenik kenarlar diferansiye olmamış hücreler ve preosteoblastlardan oluşur. Zaman içinde karşı karşıya gelen kenarlardan kranial sütürler oluşur. Beyin büyümesi devam ederken osteojenik kenarlardan kemik yapımı da devam eder; ancak komşu kemikle herhangi bir temas veya kaynama olmaz. Bir teoriye göre karşı karşıya gelen osteojenik kenar hücrelerinde apoptoz veya programlı hücre ölümü gerçekleşmesi bu teması engeller (68).

Dura materin, kranial sütürlerin biyolojisinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Duranın bu etkisini, üstteki sütürlere sıkıca bağlı olduğu fibröz ligamanlarla veya büyüme faktörleri yoluyla ilettiği şeklinde çeşitli görüşler mevcuttur. Sütür biyolojisini etkileyen büyüme faktörlerinin internal periost gibi davranan duradan kaynaklanarak etki ettiği düşünülmektedir (69). Fiziksel kuvvetlerin ortada olmadığı bir doku kültürü çalışmasında sütür ve dura arasındaki bilgi alışverişi veya işaretleşmenin, parakrin yolla bazı büyüme faktörleri tarafından sağlandığı gösterilmiştir (70). Diğer araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da, büyüme faktörlerinin kranial sütürlerin kapanmasını düzenleyici, parakrin bir etkileri olduğu gösterilmiştir (29, 71, 72). Opperman ve diğ., fibroblast kökenli büyüme faktörlerinin kranial sütürlerin açık kalmasını sağlayan sütür – dura arası iletişimi sağlayan maddeler olduğunu ve kranial kaide kuvvetlerinden bağımsız olarak fetal sütür morfogenezinde etkili

olduklarını ileri sürmüşlerdir (69, 70). Ayrıca bu faktörlerin kranial sütürlerdeki gelişim patolojilerine bağlı olarak, kraniofasial anomalilerde de rol oynadığı gösterilmiştir.

FGF reseptör mutasyonları Apert, Crouzon, Pfeiffer ve daha nadir görülen birçok kraniosinostoz sendromundaki temel sebeptir. Mutasyonların önemli bir kısmı FGF-R2'den kaynaklanmakta, daha az bir kısmı FGF-R3'ten, bir tanesi de FGF-R1'den köken almaktadır (32). FGF-R4 kaynaklı bir mutasyon henüz gösterilememiştir.

Prostaglandinler humoral bir mekanizma ile artrit, periodontal hastalıklar, osteomyelit ve kırık gibi kemik rahatsızlıklarında lokal kemik rezorpsiyonu veya oluşumuna etki etmektedirler. PG E'nin *in vitro*, *in vivo* ve çeşitli patolojik durumlarda kemik rezorpsiyonunu stimüle ettiği çok sayıda çalışmada bildirilmiştir (44). Bu bilgilerden değişik olarak prostaglandinlerin kemik oluşumunu stimüle edici etkileri hakkında da gerek deneysel (44, 46 - 51) gerekse klinik (52 - 54) çok sayıda yayın mevcuttur. Ancak verilen prostaglandin dozu ve morfolojik değerlendirme yöntemlerinin çok değişik olması bu araştırmalar arasında karşılaştırmalar yapmayı imkansız hale getirmektedir.

Konjenital siyanotik kalp hastalıklarında PG E kullanımı sonrasında gelişen periosteal kemik oluşumları köpek ve rat modellerinde gösterilmiş olup benzer protokollü çalışmalarda ortaya çıkan sonuçlar arasında yer almadığı da olmuştur. Ueno tarafından yapılan çalışmada ratlara 0.3 – 6 mg / kg / gün PG E₂ uygulanmış ve tibia ile vertebra örnekleri histolojik olarak incelenmiştir. Proksimal tibia

metafizinde kortikal endosteal yüzlerde kemik birikimi, ilik kavitesinde küçülme ve kemik doku kütlesinde artış saptanmıştır. PG E₂'nin etki mekanizması tam olarak açıklanamamakla beraber vazodilatasyona bağlı kan akımındaki artışın dikkate alınması gerektiği belirtilmiştir (44).

PG E₂'nin *in vivo* etkilerini inceleyen çalışmalarda kemik büyüme hızının azaldığı, metafizyel sert doku kütlesinin belirgin olarak arttığı, periosteal ve endokortikal kemik yapımının arttığı gösterilmiştir (73, 74). PG E₂'nin sistemik uygulamasının hem kansellöz, hem de kortikal kemik yapımını arttırdığı, osteoblast sayısında artışa yol açtığı ve kemik şekillenme ve yeniden şekillenmesini (remodelling) aktive ettiği bildirilmiştir. PG E₂'nin pozitif kemik dengesine yol açan anabolik etkisi mevcuttur. PG E₂'nin sistemik yan etkilerinden kaçınmak için lokal intraosseöz uygulanması sonucunda da metafizyel kemik kütlesi, osteoblast ve osteoklast sayılarında artma gibi benzer sonuçlar alınmıştır (50).

PG E₂'nin rat uzun kemikleri ve kalvariumundaki etkilerini inceleyen bir çalışmada uzun kemiklerin uzunlamasına büyümesinde azalma, kemik kütlelerinde artış ve femur boynunun mekanik gücünde artış saptanmıştır. Kalvarial kemiklerin kalınlığında artış gözlenmemekle beraber diploik mesafenin tama yakın daraldığı ve kalvarial kemiklerin yoğunluğunda artış olduğu gösterilmiştir (51). Araştırmacılar, PG E₂'nin kemikler üzerindeki anabolizan etkisini osteoprogenitor hücrelerden yeni osteoblast oluşumunu arttırması mekanizması ile açıklamışlardır.

Prostaglandinlerin kemik doku üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalarda sıklıkla PG E₂'nin etkileri incelenmiş olmakla beraber prostasiklinin etkilerini inceleyen az sayıda olsa da yayın mevcuttur (55-58).

Farr (55) tarafından yapılan bir *in vitro* çalışmada PG E₁, E₂, F₂ ve prostasiklinin osteoklastlardan zengin bir hücre kültüründeki etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada prostasiklinin diğer prostaglandinlerle eşdeğer bir aktivite gösterdiği ve osteoklastlara kalsiyum girişini arttırdığı saptanmıştır. Prostaglandinlerin osteoklastlar üzerindeki etkilerinin hücre kalsiyum girişini arttırarak olduğu, osteoblastlar üzerinde ise bu mekanizma ile etkili olmadıkları ileri sürülmüştür.

Rawlinson (56) tarafından yapılan bir *in vitro* çalışmada siklik mekanik yükleme yapılan köpek kansellöz kemiklerinde PG E₂ ve PG I₂ düzeylerinde yükselme olduğu saptanmıştır. PG I₂ üretiminin yükleme sonrası erken dönemde arttığı, bu artışın da özellikle kemiğin yüzeyel hücreleri ve osteositlerde RNA sentezini tetikleyerek kemik şekillenme – yeniden şekillenme işlemini başlattığını göstermişlerdir. Dışarıdan verilen PG I₂ sonrası siklik yükleme yapıldığında da RNA artışı gösterilmiştir. Artmış RNA üretiminin de yeni kemik oluşumunu başlatan bazı sitokin ve büyüme faktörlerine spesifik olabileceği iddia edilmiştir.

Rawlison (57) tarafından yapılan bir diğer *in vitro* çalışmada, dışardan verilen prostasiklinin mekanik yükleme sonucu oluşan RNA artışına benzer bir RNA artışına yol açtığını ve kemik şekillenme – yeniden şekillenme işleminin IGF- II üzerinden yürüdüğünü

göstermişlerdir. Mekanik yükleme sonrası başlayan olaylar zincirinin erken evrelerinde prostaglandinlerin yer aldığı, prostasiklinin de bu dönemde PG E₂'ye göre daha önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir.

PG I₂'nin yarı ömrünün kısa olması nedeniyle stabil bir analogu olan iloprost'un kullanıldığı *in vitro* bir çalışmada, kültüre osteoblast hücrelerine uygulanan 2 atm. basıncın sonrasında, PG I₂ ve kemik hücre fizyolojisinde önemli bir düzenleyici olan *c-fos* mRNA içeriğinin arttığı gösterilmiştir (58). Dışardan verilen iloprost ile de benzer bir sonuç elde edilmiş ve PG I₂'nin, hidrostatik basınç streslerinin *c-fos* mRNA transkripsiyonunu indüklemesi aşamasında önemli bir rolü olduğu iddia edilmiştir.

Prostaglandinlerin sistemik kullanımları sınırlı olmakla beraber özellikle PG E₂, yüksek ameliyat riski olan konjenital siyanotik kalp hastası bebeklerde yaygın kullanım alanı bulmuştur. Uzun süreli (90 gün üzeri) ve düşük dozlu tedavinin bu bebeklerde az yan etkiye yol açtığı ve başarılı sonuçlar verdiği gösterilmiştir. Bununla beraber bazı yayınlarda uzun süreli PG E uygulamasının uzun kemiklerde hassasiyet ve periosteal yeni kemik oluşumuna yol açtığı, bazı bebeklerde de kranial sütürlerde genişlemeye yol açtığı bildirilmiştir. Bu genişlemenin tedavinin kesilmesinden sonraki 5 ay içinde herhangi bir sekel bırakmadan normale döndüğü de gözlemlenmiştir. Prostasiklin analogu olan iloprost pulmoner hipertansiyonlu çocuklarda akciğer vasküler yatağının vazodilatasyonunda ve periferik damar hastalığı olan hastalarda periferik vazodilatasyon için sistemik olarak kullanılmaktadır.

Literatürde prostaglandinlerin kemik metabolizması üzerine olan etkilerinin incelendiği çok sayıda araştırma bulunmakla beraber kranial sütürler üzerine olan etkilerinin incelendiği herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır. Ancak daha önce de belirtildiği gibi az sayıdaki klinik olgu sunumlarında PG E'nin kranial sütürlerde genişlemeye yol açtığı bildirilmiştir (66, 67).

Glukokortikoid tedavisi veya artmış endojen üretiminin yeni kemik oluşumunu azalttığı, kemik rezorpsiyonunu arttırdığı ve osteoporoz gibi ana bir komplikasyona yol açtığı bilinmektedir (80 – 82). Glukokortikoidlerin bu etkiyi iki değişik yolla gerçekleştirdikleri gösterilmiştir. Birincisi glukokortikoidlerin paratiroid hormonu sekresyonunu arttırarak kemik rezorpsiyonuna yol açmasıdır (83, 84). Bu mekanizmaya ek olarak glukokortikoidlerin osteoblast apoptozunu arttırarak osteoblast çoğalması ve fonksiyonlarını inhibe ettiği gösterilmiştir (85 – 88). Glukokortikoidlere bağlı gelişen osteoporozda kemik duvar kalınlıklarında azalma, her yeniden yapılanma siklusunda yenilenen kemik miktarında azalma ve osteoblast aktivite ve yaşam sürelerinde azalma olmaktadır (90). Glukokortikoidler ayrıca prostasiklin oluşumunda rol oynayan siklooksigenaz enzimini de kuvvetli bir şekilde inhibe ederek anti-inflamatuar etki yaratmaktadırlar (89).

Transforming growth factor β , insulin-like growth factor II, fibroblast growth factor gibi büyüme faktörlerinin, kranial sütürlerin ve kranial defektlerin kapanmasında parakrin yolla düzenleyici bir rolü olduğu bilinmektedir. Kapanmakta olan kranial sütürlerde, TGF β

immünreaktivitesinin arttığı, açık sütürlerde ise işaretlenmenin az olduğu veya olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca kalvariumda cilt altı dokuya verilen TGF β 'nın periost tabakasında proliferasyon ve yeni kemik yapımına yol açtığı da gösterilmiştir (38, 79). Çalışmamızda, TGF β işaretlenmesinin, deney ve kontrol gruplarında frontal sütün aktif kemikleşme sürecinde olduğu onbeşinci günde; sagittal sütte ise aktif sürecin devam ettiği on beş ve otuzuncu günlerde, bağ dokusundaki fibroblastlar ve yeni kemik matriksini sentezlemekte olan osteoblast gruplarında arttığı izlendi

Dışardan verilen bazik FGF'nin osteogenezi hızlandığı, kemik oluşumu ve kırık iyileşmesi sırasında da FGF ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (39). FGF reseptör mutasyonları ise kraniosinostoz sendromlarının etyolojisinde önemli yer almaktadır. Özellikle FGF-R1 ve FGF-R2'deki mutasyonlar Apert, Crouzon, Pfeiffer ve daha nadir görülen bazı sendromik kraniosinostozların etyolojik sebebidir. Mutasyona uğramış FGF reseptörleri devamlı aktif kalmakta ve aşırı fonksiyon sergilemektedir. Sendromik kraniosinostozlardaki patolojik sütün kapanması bu mekanizma ile açıklanmaktadır. Kapanmakta olan kranial sütürlerde görülen artmış FGF immün boyanması da bu mekanizma ile uyumluluk göstermektedir (39).

Çalışmamız boyunca elde edilen doku örneklerinin immünohistokimyasal değerlendirmelerinde TGF- β 1 ve FGF-2 ekspresyonları, iloprost uygulanan gruplarda gerek frontal sütte, gerekse de sagittal sütte artmış olarak izlendi. İmmünohistokimyasal incelemeler sonucunda elde edilen sonuçlar sütün kapanması sürecinde

beklenen TGF- β 1 ve FGF-2 ekspresyonlarındaki artış eğilimine uygundur. Ancak elde edilen artış istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Prostatiklinin analogu iloprostun sütür kapanması açısından yeterince kuvvetli bir uyarıcı olmaması, bu artışın yetersiz olmasını açıklayabilecek seçeneklerden birini oluşturmaktadır. Sütür daralması yönünde bir etki göstermekle beraber bu etki tam kapanmaya yol açmamış ve TGF- β 1 ve FGF-2 ekspresyonlarındaki artış şiddetli olmamıştır. İmmünohistokimyasal boyama sırasında teknik bir zorluk olarak ortaya çıkan zemin aktivitesinin azaltılamaması ve immünohistokimya inceleme sonuçlarının değerlendirilmesinde kesin sonuç verebilecek ideal sayısal bir yöntemin bulunmaması da istatistiksel olarak anlamlı bir farkın saptanmasını engellemiş olabilir. Literatür incelendiğinde de benzer sonuçlarla karşılaşmaktadır (61).

Sütür kapanması histolojik olarak değerlendirildiğinde de, 15. günde, iloprost verilen gruplarda sütür alanlarının daraldığı, kemikleşmenin başladığı ancak tam bir sütür kapanmasının gerçekleşmediği görüldü. Frontal suture ait örneklerin sagittal suture oranla kemikleşme sürecinde daha ilerde olduğu görüldü. Otuz ve 45. günlerde yapılan histolojik incelemelerde prostatiklin verilen gruplarda kemik yeniden yapılanmasının ve ilik elemanlarının şekillenmesinin kontrol grubuna oranla daha ileri aşamada olduğu saptandı. Ayrıca sütürlerin tam olarak kapanmadığı ancak kemikleşmenin kontrol gruplarına oranla daha ileri aşamalarda olduğu gösterildi.

İloprost etkisini antagonize etmek için iloprost + deksametazon verilen gruplarda ise özellikle 15. günde daha belirgin olmak üzere sütün iyileşmesinin iloprost gruplarından daha düşük, kontrol grubu ile benzer düzeylerde olduğu görüldü. İmmünohistokimyasal değerlendirmelerde de FGF ve TGF ekspresyon skorları iloprost gruplarına göre daha düşük ve zaman zaman eşit seyretti. İloprostun kemik yapımını ve sütün kapanmasını hızlandırıcı etkisinin deksametazonun kemik doku üzerindeki osteoporotik etkisi tarafından antagonize edildiği görüldü. Deksametazonun bu etkiyi osteblast fonksiyonları üzerindeki baskılayıcı rolüyle gerçekleştirdiği düşünülmüştür.

Kontrol ve deney grupları morfolojik ölçümler açısından karşılaştırıldığında, ölçümlerin önemli bir kısmında istatistiksel olarak anlamlı bulunan farklılıklar ortaya çıkmıştır. Elde edilen morfolojik ölçüm sonuçları ile histolojik sütün kapanma dereceleri korelasyon analizine tabi tutulduğunda, iki ölçümde pozitif, bir ölçümde de negatif yönde anlamlı korelasyon saptandı. Ancak Virchow kanunu göz önüne alınarak yapılan değerlendirmede bu korelasyonların klinik olarak geçerli olamayacağı düşünüldü.

Benzer şekilde, morfolojik ölçüm değerleri ile histolojik sütün kapanma dereceleri çapraz olarak incelendiğinde klinik olarak anlamlı olabileceği düşünülen ölçümlerin de korelasyon analizinde istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar vermediği görüldü.

Elde edilen morfolojik ölçüm sonuçları ile TGF- β 1 ve FGF-2'nin immünohistokimyasal değerlendirme sonuçları arasında da korelasyon

analizi yapılmıştır. Bu analiz sonrası altı ölçümde istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilse de sonuçlar Virchow kanunu esas alınarak incelendiğinde klinik olarak uyumlu bulunmadı.

Anatomik olarak kranial sütürler alttaki duraya sıkı olarak bağlı olup dura mater kranial kemikler için bir internal periost gibi davranmaktadır. Bu şekilde büyüme faktörleri sütür hatlarına kuvvetle etki edebilmektedir. Bu çalışmada, stabil bir prostasiklin analogu olan iloprostun kranial sütürler üzerinde daraltıcı bir etkisinin olduğu, frontal ve sagittal sütürde kapanmanın belirgin olarak hızlandığı gerek hem rutin histolojik değerlendirmede hem de immünohistokimyasal yöntemlerle saptanmıştır. Bu süreçte büyüme faktörlerinden TGF- β 1 ve FGF-2'nin rol aldığı gösterilmiştir. Ek olarak deksametazonun kemik yapımını azaltıcı, kemik yıkımını arttırıcı etkileri ile iloprostun sütürler üzerindeki daraltıcı etkisini engellediği de gösterilmiştir.

TGF- β 1 ve FGF-2'nin kranial sütürlerin ve kranial defektlerin kapanmasında parakrin yolla düzenleyici bir rolü olduğu bilinmektedir. Büyüme faktörlerinin sütürler üzerindeki düzenleyici rolünün varlığının kesin olduğu, ancak karışık bir olaylar zincirinde daha erken bir basamağın kemikleşmeyi başlattığı ve büyüme faktörlerinin kraniosinostozlar için primer başlatıcı bir faktör olmadığı düşünülmektedir. Bu çalışmada iloprost uygulaması ile başlayan değişiklik zincirinde büyüme faktörlerinin yer aldığı gösterilmiştir.

Literatür incelemesinde, kemik dokular üzerine etkileri bilinen büyüme faktörlerinin, kranial sütürler üzerindeki etkilerini inceleyen bir

araştırmaya rastlanılmamıştır. Çalışmamızda prostasiklin analoğu iloprostun, uygulanan dozlarda sıçanlarda kranial sütürlerin tam kapanmasını sağlamadığı; ancak büyüme ve kemikleşme sürecini ikinci haftanın sonundan itibaren daha belirgin olmak üzere hızlandırdığı ve bu etkinin deksametazon ile engellenebildiği sonucuna varılmıştır.

6. SONUÇ

Kontrol ve deney gruplarından elde edilen morfolojik ölçüm sonuçları karşılaştırıldığında, sonuçların önemli bir kısmında istatistiksel olarak anlamlı bulunan farklılıklar ortaya çıkmıştır.

Histolojik incelemelerde prostasiklin verilen gruplarda kemik yeniden yapılanmasının ve ilik elemanlarının şekillenmesinin kontrol grubuna oranla daha ileri aşamada olduğu saptandı. Ancak sütürlerin tam olarak kapanmadığı fakat kemikleşmenin kontrol gruplarına oranla daha ileri aşamalarda olduğu gösterildi. Frontal sütüre ait örneklerin sagittal sütüre oranla kemikleşme sürecinde daha ilerde olduğu görülmüştür.

Doku örneklerinin immünohistokimyasal değerlendirmelerinde TGF- β 1 ve FGF-2 ekspresyonları, iloprost uygulanan gruplarda gerek frontal sütürde, gerekse de sagittal sütürde artmış olarak izlendi. Gerek histolojik gerekse de immünohistokimyasal değerlendirmelerde iloprost – deksametazon grubu kontrol grubu ile benzer sonuçlar gösterdi.

Morfolojik ölçüm değerleri, histolojik ve immünohistokimyasal incelemeler sonucunda elde edilen sonuçlara korelasyon analizi yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı bazı sonuçlar elde edilmekle beraber, bu sonuçlar Virchow kanunu esas alınarak incelendiğinde klinik olarak uyumlu bulunmadı.

Büyüme faktörlerinin sütürler üzerindeki düzenleyici rolünün varlığının kesin olduğu, ancak karışık bir olaylar zincirinde daha erken bir basamağın kemikleşmeyi başlattığı ve büyüme faktörlerinin

kraniosinostozlar için primer başlatıcı bir faktör olmadığı düşünülmektedir.

Bu çalışmada, stabil bir prostasiklin analogu olan iloprostun kranial sütürler üzerinde daraltıcı bir etkisinin olduğu, frontal ve sagittal sütürde kapanmanın belirgin olarak hızlandığı ve bu etkinin deksametazon ile baskılanabildiği saptanmıştır.

7. KAYNAKLAR

- 1- Kokich, V.G., Biology of sutures, "Craniosynostosis: Diagnosis, Evaluation and Management" (Ed. M. M., Cohen)'de Raven Press, New York, s. 81-103, 1986.
- 2- Cohen, M.M.Jr., Sutural Pathology, "Craniosynostosis: Diagnosis, Evaluation and Management" (Ed. M. M. Cohen and R.E. MacLean)'de, New York-Oxford University Press, New York-Oxford, s. 51-68, 2000.
- 3- Cohen, M.M.Jr., Craniosynostosis update: 1986-1987, Am. J. Med. Genet. Suppl., 4, 99-148, 1988.
- 4- Cohen, M.M.Jr., Etiopathogenesis of craniosynostosis, Neurosurg., 2, 507-513, 1991.
- 5- Cohen, M.M.Jr., Genetic perspectives on craniosynostosis and syndromes with craniosynostosis, J. Neurosurg. 47, 886-898, 1977.
- 6- Cohen, M.M.Jr., Sutural biology and the correlates of craniosynostosis, Am. J. Med. Genet. 47, 581-616, 1993.
- 7- Gorlin, R.J., Cohen, M.M.Jr., Levin, L.S. Syndromes of the head and the neck, III. Baskı, Oxford University Press, New York, 1990.
- 8- Johnsonbaugh, R.E., Bryan, R.N., Hierlwimmer, U.R., Georges, L.P. Premature craniosynostosis: A common complication of juvenile thyrotoxicosis, J. Pediatr. 93, 188-191, 1978.
- 9- Duggan, C.A., Keener, E.B., Gay, B.B., Secondary craniosynostosis, J. Roentgenol, 109, 277-293, 1970.
- 10- Hollingsworth, D.R., Mabry, C.C., Congenital Graves disease: Four familial cases with longterm follow-up and perspective, Am. J. Dis. Child. 130, 148-155, 1976.
- 11- Riggs, W., Wilrow, R.S., Etteldorf, J.N., Neonatal hypertelorizm with accelerated skeletal maturation, craniosynostosis, and brachydactyly., Radiology, 105, 621-625, 1972.
- 12- Robinson, D.C., Hall, R., Munro, D.S. Graves disease, an unusual complication: Raised intracranial pressure due to premature fusion of skull sutures. Arch. Dis. Child. 44, 252-257, 1969.

- 13-Coleman, E.N., Foote, J.B. Craniostenosis with familial rickets. *Br. Med. J.* 1, 561-562, 1954.
- 14-Imerslund, O. Craniostenosis and vitamin D resistant rickets. *Acta Paediatr.* 40, 449-456, 1951.
- 15-McCarthy, J.G., Reid, C.A., Craniofacial synostosis in association with vitamin D-resistant rickets. *Ann. Plast. Surg.* 4, 149-153, 1980.
- 16-Duggan, C.A., Keener, E.B., Gay, B.B. Secondary craniosynostosis. *Am. J. Roentgenol.* 109, 277-293, 1970.
- 17-Grabb, P.A., Albright, L., Zitelli, B.J. Multiple suture synostosis, macrocephaly, and intracranial hypertension in a child with α -D-mannosidase deficiency. Case report. *J. Neurosurg.* 82, 647-649, 1995.
- 18-Dykstra, O.H., Halbertsma, T. Polycythemia vera in childhood. *Am. J. Dis. Child.* 50, 907-916, 1940.
- 19-Smith, D.W., Töndury, G. Origin of the calvaria and its sutures. *Am. J. Dis. Child.* 132, 662-666, 1978.
- 20-Lorber, J. The prognosis of occipital encephalocele. *Dev. Med. Child Neurol. (Suppl)* 13, 75-86, 1967.
- 21-Cohen, M.M. Jr. Perspectives on craniosynostosis. *West. J. Med.* 132, 508-514, 1980.
- 22-Cohen, M.M. Jr., Lemire, R.J. Syndromes with cephaloceles. *Teratology*, 25, 1961-1972, 1982.
- 23-Roberts, J.R., Rickham, P.P. Craniostenosis following Holter valve operation. *Dev. Med. Child Neurol.* 122 (Suppl 12), 145-149, 1970.
- 24-Centrella, M., Horowitz, M.C., Wozney, J.M., McCarthy, T.L. Transforming growth factor- β gene family members and bone. *Endocr. Rev.* 15, 27-39, 1994.
- 25-Cohen, M.M. Jr. Transforming growth factor- β s and fibroblast growth factors and their receptors: Role in sutural biology and craniosynostosis. *J. Bone Miner. Res.* 12, 322-331, 1997.

- 26-Kingsley, D.M. The TGF- β superfamily: New members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev.* 8, 133-146, 1994.
- 27-Opperman, L.A., Nolen, A.A., Ogle, R.C. TGF β 1, TGF β 2, and TGF β 3 exhibit distinct patterns of expression during cranial suture formation and obliteration in vivo and in vitro. *J. Bone Miner. Res.* 12, 301-310, 1997.
- 28-Roth, D.A., Longaker, M.T., McCarthy, J.G., Rosen, D.M., McMullen, H.F., Levine, J.P., Sung, J., Gold, L.I. Studies in cranial suture biology. Part I: Increased immunoreactivity for TGF isoforms (β 1, β 2, β 3) during rat cranial suture fusion. *J. Bone Miner. Res.* 12, 311-321, 1997.
- 29-Roth, D.A., Gold, L.I., Han V.K.M., McCarthy, J.G., Sung, J., Wishoff, J.H., Longaker, M.T. Transforming growth factor β 1, β 2, and β 3 and insulin-like growth factor I in premature cranial suture fusion. *Plast. Reconstr. Surg.* 99, 300-309, 1997.
- 30-Cohen, M.M. Jr. Discussion: Immunolocalization of transforming growth factor β 1, β 2, and β 3 and insulin-like growth factor I in premature cranial suture fusion. *Plast. Reconstr. Surg.* 99, 310-316, 1997.
- 31-Cohen, M.M. Jr. Transforming growth factor β s and fibroblast growth factors and their receptors: Role in sutural biology and craniosynostosis. *J. Bone Miner. Res.* 12, 322-331, 1997.
- 32-Cohen, M.M.Jr., *Fibroblast Growth Factor Receptor Mutations, "Craniosynostosis: Diagnosis, Evaluation and Management"* (Ed. M. M. Cohen and R.E. MacLean)'de, New York-Oxford University Press, New York-Oxford, s. 77-94, 2000.
- 33-Jabs, E.W., Xiang, L., Scott, A.D., et al. Jackson-Weiss and Crouzon syndromes are allelic with mutations in fibroblast growth factor receptor 2. *Nat. Genet.* 8, 275, 1994.
- 34-Reardon, W., Winter, R.M., Rutland, P., Pulleyn, L.J., Jones, B.M., Malcolm, S. Mutations in the fibroblast growth factor growth factor

- receptor 2 gene cause Crouzon syndrome. *Nat. Genet.* 8, 98, 1995.
- 35-Wilkie, A.O.M., Slaney, S.F., Oldridge, M, et al., Apert syndrome results from localized mutations of FGFR2 and is allelic with Crouzon syndrome. *Nat. Genet.* 9, 165, 1995.
- 36-Wilkie, A.O.M., Morriss-Kay, G.M., Jones, E.Y., Heath, J.K. Functions of fibroblast growth factors and their receptors. *Curr. Biol.* 5, 500, 1995.
- 37-Fallon, J.F., Lopez, A., Ros, M.A., Savage, M.P., Olwin, B.B., Simandi, K.B. FGF-2: Apical ectodermal ridge growth signal for chick limb development. *Science*, 264, 104, 1994.
- 38-Most, D., Levine, J.P., Chang, et al. Studies in cranial suture biology: Up-regulation of transforming growth factor-beta 1 and basic fibroblast growth factor mRNA correlates with posterior frontal cranial suture fusion in the rat. *Plast. Reconstr. Surg.* 101, 1431, 1998.
- 39-Mehrara, B.J., Mackool, R.J., McCarthy, J.G., Gittes, G.K., Longaker, M.T. Immunolocalization of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-1 and receptor-2 in rat cranial sutures. *Plast. Reconstr. Surg.* 102, 1805-1817, 1998.
- 40- Goodson, J.M., Dewhirst, F.E., Brunetti, A. Prostaglandin E₂ levels and human periodontal disease. *Prostaglandins* 6, 81-85, 1974.
- 41-Yamasaki, K., Miura, F.D., Suda, T. Prostaglandin as a mediator of bone resorption induced by experimental tooth movement in rats. *J. Dent. Res*, 59, 1635-1642, 1980.
- 42-Dekel, S., Lenthall, G., Francis, M.J.O. Release of prostaglandins from bone and muscle after tibial fractures: An experimental study in rabbits. *J. Bone Joint Surg.* 63B, 185-189, 1981.
- 43-Bennett, A. ve Harvey, W. Prostaglandins in orthopaedics. *J. Bone Joint Surg.* 63B, 152-154, 1981.
- 44-Ueno, K., Haba, T., Woodbury, D., Price, P., Anderson, R., Jee, W.S.S. The effects of prostaglandin E₂ in rapidly growing rats:

- Depressed longitudinal and radial growth and increased metaphyseal hard tissue mass. *Bone*, 6, 79-86, 1985.
- 45-Conaway, H.H., Diez, L.F., Raisz, L.G. Effects of prostacyclin and prostaglandin E₂ bone resorption in the presence and absence of parathyroid hormone. *Calcif. Tissue Int.* 38, 130-134, 1986.
- 46-Blumenkrantz, N., ve Sondergaard, J. Effect of prostaglandins E1 and E1 α on biosynthesis of collagen. *Nature New Biol.* 239, 246, 1972.
- 47-Goodson, J.M., McClatchy K., Revell, C. Prostaglandin induced resorption of the adult rat calvarium. *J. Dent. Res.* 53, 670-677, 1974.
- 48-Nefussi, J.R., Baron, R. PGE₂ stimulates both resorption and formation of bone in vitro: differential responses of the periosteum and the endosteum in fetal rat long bone cultures. *Anat Rec.* 211, 9-16, 1985.
- 49-Chyun, Y.S., Raisz, J.G. Stimulation of bone formation by prostaglandin E₂. *Prostaglandins.* 27, 97-103, 1984.
- 50-Yang, R.S., Liu, T.K., Lin-Shiau, S.Y. Increased bone growth by local prostaglandin E₂ in rats. *Calcif. Tissue Int.* 52, 57-61, 1993.
- 51-Suponitzky, I., Weinreb, M. Differential effects of systemic prostaglandin E₂ on bone mass in rat long bones and calvaria. *J. Endocrinol.* 156, 51-57, 1998.
- 52-Ueda, K., Saito, A., Nakano, H., Aoshima, M., Yokota, M., Muraoka, R., Iyawa, T. Cortical hyperostosis following long term administration of prostaglandin E₂ in infants with cyanotic congenital heart disease. *J. Pediatr.* 97, 834-836, 1980.
- 53-Sone, K., Tashiro, M., Fujinaga, T., Romomasa, T., Tokuyama, K. Kurome, T. Long term low dose prostaglandin E₁ administration. *J. Pediatr.* 97, 866-867, 1980.
- 54-Ringel, R.E., Brenner, J.I., Haney, P.J., Burns, J.E., Moulton, A.L., Berman, M.A. Prostaglandin-induced periostitis: a complication of

- long-term PGE1 infusion in an infant with congenital heart disease. *Radiology*. 142, 657-658, 1982.
- 55-Farr, D., Pochal, W., Brown, M., Shapiro, E., Wienfeld, N., Dziak, R. Effects of prostaglandins on rat calvarial bone cell calcium. *Archs. Oral Biol*. 29, 885-891, 1984.
- 56-Rawlinson, S.C., El-Haj, A.J., Minter, S.L., Tavares, I.A., Bennett, A., Lanyon, L.E. Loading-related increases in prostaglandin production in cores of adult canine cancellous bone in vitro: a role for prostacyclin in adaptive bone remodeling? *J Bone Miner Res*. 6,1345-51, 1991.
- 57-Rawlinson, S.C., Mohan, S., Baylink, D.J., Lanyon, L.E. Exogenous prostacyclin, but not prostaglandin E2, produces similar responses in both G6PD activity and RNA production as mechanical loading, and increases IGF-II release, in adult cancellous bone in culture. *Calcif. Tissue Int*. 53, 324-9, 1993.
- 58-Glantschnig, H., Varga, F., Rumpler, M, Klaushofer, K. Prostacyclin (PG I₂): a potential mediator of c-fos expression induced by hydrostatic pressure in osteoblastic cells. *Eur J Clin Invest*. 26, 544-8, 1996.
- 59-Ueda, K., Saito, A., Nakano, H., Aoshima, M., Yokota, M., Muraoka, R., Iwaya, T. Cortical hyperostosis following long-term administration of prostaglandin E1 in infants with cyanotic congenital heart disease. *J Pediatr*. 97, 834-836, 1980.
- 60-Sone, K., Tashiro, M., Fujinaga, T., Tomomasa, T., Tokuyama, K., Kuroume, T. Long-term low-dose prostaglandin E1 administration. *J Pediatr*. 97, 866-867, 1980.
- 61-Ringel, R.E., Brenner, J.I., Haney, P.J., Burns, J.E., Moulton, A.L., Berman, M.A. Prostaglandin-induced periostitis: a complication of long-term PGE1 infusion in an infant with congenital heart disease. *Radiology*. 142, 657-658, 1982.
- 62-Hoevels-Guerich, H., Haferkorn, L., Pergigehl, M., Hofstetter, R., von Bernuth, G. Widening of cranial sutures after long-term

- prostaglandin E₂ therapy in two newborn infants. *J Pediatr* .105, 72-74, 1984.
- 63-Beitke, A., Stein, J. Pseudo-widening of cranial sutures as a feature of long-term prostaglandin E₁ therapy. *Pediatr. Radiol.* 16, 7 – 58, 1986.
- 64-Moss, M.L. Growth of the calvaria in the rat. *Am. J. Anat.* 94, 333-358, 1954.
- 65-Animal Models in Orthopedic Research, An YH and Friedman RJ eds., CRC press, Raton, pp 251-259, 1999.
- 66-Korkusuz, P., A. Dağdeviren, E. Aşan, “Immunophenotypic Analysis of Human Spleen Compartments, ” *Annals of Anatomy*, 184, 431-441, 2002.
- 67-Akita S, Hirano A, Fujii T. Identification of IGF-1 in the Calvarial Suture of Young Rats: Histochemical Analysis of the Cranial Sagittal Sutures in Hyperthyroid Rat Model. *Plast. Reconstr. Surg.* 97, 1-12, 1996.
- 68-Furtwangler, J.A., Hall, S.H., Koskinen-Moffet, L.K. Sutural morphogenesis in the mouse calvaria: The role of apoptosis. *Acta. Anat. (Basel)* 124, 74-80, 1985.
- 69-Levine, J.P., Bradley, J.P., Roth, D.A., McCarthy, J.G., Longaker, M.T. Studies in cranial suture biology: Regional dura mater determines overlying suture biology. *Plast. Reconstr. Surg.* 101, 1441-1447, 1998.
- 70-Opperman, L.A., Passarelli, R.W., Morgan, E.P., Reintjes, M., Ogle, R.C. Cranial sutures require tissue interactions with dura mater to resist osseous obliteration in vitro. *J Bone Miner Res.* 10, 1978-87, 1995.
- 71-Beck, L.S., Amento, E.P., Xu, Y. TGF-beta 1 induces bone closure of skull defects: temporal dynamics of bone formation in defects exposed to rhTGF-beta 1. *J Bone Miner Res.* 8, 753-761, 1993.
- 72-Opperman, L.A., Sweeney, T.M., Redmon, J., Persing, J.A., Ogle, R.C. Tissue interactions with underlying dura mater inhibit osseous

- obliteration of developing cranial sutures. *Dev. Dyn.* 198, 312-322, 1993.
- 73-Shih, M.S., Norrdin, R.W. Effects of prostaglandin on regional remodelling changes during tibial healing in beagles. *Calcif. Tissue Int.* 39, 191 – 197, 1986.
- 74-Jee, W.S.S., Ueno, K., Deng, Y.P., Woodbury, D.M. The effects of prostaglandin E2 in growing rats. *Calcif. Tissue Int.* 37, 148 – 157, 1985.
- 75-Jurkowska, G., Dlugozs, J.W., Rydzewska, G., Andrzejewska, A. The effect of prostacyclin analogue--iloprost on the pancreas regeneration after caerulein-induced acute pancreatitis in rats. *J Physiol Pharmacol.* 47, 629 – 640, 1996.
- 76-Korbut, R., Gryglewski, R.J. The effect of prostacyclin and nitric oxide on deformability of red blood cells in septic shock in rats. *J Physiol Pharmacol.* 47, 591 – 599, 1996.
- 77-Akarsu, E.S., Palaoğlu, O. Ayhan, I.H. Iloprost-induced writhing in mice and its suppression by morphine. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 11, 273 – 275, 1989.
- 78-Frick, A., Baumeister, G.H., Menger, M.D., Vollmar, B., Wohllaib, U., Wiebecke, B. Secondary ischaemia in experimental free flaps – treatment by long acting prostacyclin analogues. *Br. J. Plast. Surg.* 52, 392 – 398, 1999.
- 79-Cohen, M.M.Jr. TGF β and Sutural biology, “Craniosynostosis: Diagnosis, Evaluation and Management” (Ed. M. M. Cohen and R.E. MacLean) de, New York-Oxford University Press, New York-Oxford, s. 69-76, 2000.
- 80-Mooney, M.P., Kraus, E.M., Bardach, J., Snodgrass, J.I. Skull preparation using the enzyme active detergent technique. *Anat. Rec.* 202, 125 – 129, 1982
- 81- Adler, R., Rosen, C.J. Glucocorticoids and osteoporosis. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 23, 641 – 654, 1994.

- 82-Lukert, B.P., Raisz, L.G. Glucocorticoid – induced osteoporosis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 20, 629 – 650, 1994.
- 83-Reid, I.R., Veale, A.G., France, J.T. Glucocorticoid osteoporosis. *J. Asthma* 31, 7 – 18, 1994.
- 84-Conaway, H.H., Grigorie, D., Lerner, U.H. Stimulation of neonatal mouse calvarial bone resorption by the glucocorticoids, hydrocortisone and dexamethasone. *J. Bone Min. Res.* 11, 1419 – 1429, 1996.
- 85-Conaway, H.H., Grigorie, D., Lerner, U.H. Differential effects of glucocorticoids on bone resorption in neonatal mouse calvaria stimulated by peptide and steroid – like hormones. *J. Endocrinol.* 155, 513 – 521, 1997.
- 86-Canalis, E. Effect of cortisol on periosteal and nonperiosteal collagen and DNA synthesis in cultured rat calvariae. *Calcif Tissue Int.* 36, 158 – 66, 1984.
- 87-Lukert, B., Mador, A., Raisz, L.G., Kream, B.E. The role of DNA synthesis in the responses of fetal rat calvariae to cortisol. *J. Bone. Miner. Res.* 6, 453 – 460, 1991.
- 88-Weinstein, R.S., Jilka, R.L., Parfitt, A.M., Manolagas, S.C. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest.* 102, 274 - 282, 1998.
- 89-Dionne, R.A., Gordon, S.M., Rowan, J., Kent, A., Brahim, J.S. Dexamethasone suppresses peripheral prostanoid levels without analgesia in a clinical model of acute inflammation. *J Oral Maxillofac Surg.* 61, 997 -1003, 2003.
- 90-Advani, S., LaFrancis, D., Bogdanovic, E. Taxel, P., Raisz, L.G., Kream, B.E. Dexamethasone suppresses in vivo levels of bone collagen synthesis in neonatal mice. *Bone* 20, 41 – 46, 1997.