



**T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
BAĞCILAR SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ KLİNİĞİ**

**SIÇANLARDA STEROİDİN İNDÜKLEDİĞİ FEMUR BAŞI
OSTEONEKROZU ÜZERİNE TİMOKİNON'UN ETKİSİ**

Dr. Mustafa Fatih Daşcı

(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

İSTANBUL/2020



**T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
BAĞCILAR SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ KLİNİĞİ**

**SIÇANLARDA STEROİDİN İNDÜKLEDİĞİ FEMUR BAŞI
OSTEONEKROZU ÜZERİNE TİMOKİNON'UN ETKİSİ**

Dr. Mustafa Fatih Daşcı

(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

**Tez Danışmanı: Op. Dr. Ender Alagöz
Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği Başasistanı**

İSTANBUL/2020

TEŞEKKÜR

Ortopedi ve Travmatoloji ihtisasım süresince mesleki eğitimde hekimlik sanatı, ahlaklı bir cerrah ve iyi bir yönetici olmanın sırlarını hiç bıkmadan öğretmeye çalışan, cerrahi yöntemden ziyade temel prensipleri kavramamı sağlayan, okumanın önemini her zaman vurgulayan, bilgisini ve meslekte 40 yıllık tecrübesini paylaşmaktan hiç çekinmeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. M. Akif Güleç'e;

İhtisasımın ilk gününden itibaren cerrahi deneyimlerini, birikimini, desteğini ve güler yüzünü esirgemeyen, bana özgüven veren tez danışmanım ve abim Op. Dr. Ender Alagöz'e

Kliniklerinde bulunduğum süre boyunca misafirperverliklerini çokça hissettiğim, çok şey öğrendiğim, cerrahi deneyimlerini, bilgi birikimini esirgemeyen, davranış şeklimin oluşmasında fazlaca katkısı bulunan, bilimsel araştırma dehası Pittsburgh Üniversitesi Ortopedik Cerrahi bölüm başkanı Prof. Dr. Freddie H. Fu, Spor Cerrahisi şefi Prof. Dr. Volker Musahl hocalarıma,

Başarının diyetinin çok çalışmak olduğunu öğrendiğim ve daha birçok şey öğreneceğim, her zaman yanımda olduğunu bildiğim, Helios Endo Klinik–Hamburg 'tan sevgili hocam ve değerli abim Doç. Dr. Mustafa Çitak 'a

Her birinden ayrı deneyim ve beceriler edindiğim kliniğimizden Doç. Dr. Oktay Adanır, Doç. Dr. Ozan Beytemür, Doç. Dr. Serdar Yüksel, Op. Dr. Mehmet Şat, Op. Dr. Kahraman Demiryontar, Op. Dr. M. Ali Baran, Op. Dr. Sever Çağlar, Op. Dr. A. Utku Gürün, Op. Dr. Erdiñ Genç abilerime,

Kıdemlilerim, can dostlarım, beraber çok şey paylaştığımız Op. Dr. Erdal Eren, Op. Dr. Tolgahan Atcı, Op. Dr. Abdurrahman Acar, Op. Dr. Hakan Özbay' a ve kliniğimizde birlikte çalışmaktan keyif aldığım; saygılarını, sevgilerini esirgemeyen asistan doktor arkadaşlarım Hamisi M. Mraja, Muhammed Uslu, Bilal Yılmaz, Alper Dikdere, Yiğit Önaloğlu, Mahsum Solmaz, Yiğit Güleriyüz, Ozan Can Biçer, Ulambadrakh Khenchhbish, Emin Can Balcı, Enes Başar, Ali Alp, Ahmet Polat'a

Çıkar, zaman ve yer gözetmeden daima destekçim olmuş ve olacak sevgili annem Pınar Daşcı, babam Mehmet Daşcı, kardeşlerim Fatma Nur ve Hayrunnisa Daşcı, dayım Mustafa Yıldız olmak üzere dahil olmaktan hep gurur duyduğum tüm aileme,

Teşekkür ederim.

Dr. Mustafa Fatih DAŞCI

İstanbul, 2020

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	v
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
ÖZET.....	xiii
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. KALÇA EKLEMİ EMBRİYOLOJİSİ.....	3
2.2. KALÇA EKLEMİ ANATOMİSİ	5
2.2.1 Kemiksel, Dizilimsel, Kapsüler ve Ligamentöz Anatomi	7
2.2.2 Kalça Eklemine Muskuler Anatomisi.....	11
2.2.2.1 Gluteal bölge kasları:	11
2.2.2.2 Uyluğun ön kompartman kasları:	12
2.2.2.2 Uyluğun medial kompartman kasları:	14
2.2.2.2 Uyluğun posterior kompartman kasları:.....	14
2.2.3 Kalça eklemine Kan Dolaşımı ve Sinirsel İnervasyonu	14
2.3. FEMUR BAŞI OSTEONEKROZU (AVASKÜLER NEKROZ).....	17
2.3.1 Femur Başı Osteonekrozu Genel Bilgiler	17
2.3.2 Femur Başı Osteonekrozu Epidemiyolojisi	18
2.3.3 Femur Başı Osteonekrozunda Etiyoloji ve Patogenez	19
2.3.4 Kortikosteroid kullanımının Femur Başı Osteonekrozundaki Patogenezi	22
2.3.5 Femur Başı Osteonekrozunda Klinik Bulgular ve Semptomlar.....	25
2.3.6 Femur Başı Osteonekrozunda Tanı	26
2.3.7 Femur Başı Osteonekrozunda Ayırıcı Tanı	29

2.3.8 Femur Başı Osteonekrozunda Sınıflandırma	30
2.3.9 Femur Başı Osteonekrozu Tedavi Seçenekleri	34
2.3.9.1 Femur başı osteonekrozunda konservatif tedavi :	36
2.3.9.2 Femur başı osteonekrozunda cerrahi tedavi :	37
2.4. TİMOKİNON (THYMOQUINONE)	39
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	44
3.1. ÇALIŞMA PLANI	44
3.1.1. Sıçanlarda Gruplama ve Femur Başı Osteonekroz Modeli oluşturulması	45
3.2. CERRAHİ TEKNİK	49
3.2.1. Anestezi	49
3.2.2 Cerrahi Teknik	51
3.3. RADYOLOJİK İNCELEME	54
3.4. HİSTOPATOLOJİK ve HİSTOMORFOMETRİK İNCELEMELER	58
3.5. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELEME	59
3.6. BİYOKİMYASAL İNCELEME	60
3.6.1. Serum Malondialdehid Ölçümü	60
3.6.2. Serum Glutasyon Ölçümü	60
3.6.3. Serum Bone Alkaline Phosphatase Ölçümü	60
3.6.4. Serum Crosslinked C- Telopeptid of Type-1 Collagen Ölçümü	61
3.6.5. Serum Osteoprotegrin Ölçümü	61
3.6.6. Serum Trigliseric Ölçümü	61
3.6.7. Serum Total Kolesterol Ölçümü	61
3.6.8. Serum HDL Kolesterol Ölçümü	61
3.6.9. Serum LDL Kolesterol Ölçümü	62
3.7. İSTATİKSEL YÖNTEMLER	62
3.8. ÇIKAR ÇATIŞMASI (CONFLICT OF INTEREST)	62

3.9. TEŞEKKÜR VE BİLGİLENDİRME	62
4. BULGULAR.....	63
4.1. RADYOLOJİK BULGULAR.....	63
4.2. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR.....	65
4.3. HİSTOMORFOMETRİK BULGULAR.....	70
4.4. İMMUNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR.....	72
4.5. BİYOKİMYASAL BULGULAR	81
5. TARTIŞMA	86
6. SONUÇLAR	96
KAYNAKÇA.....	97
ÖZGEÇMİŞ	110

KISALTMALAR

ANOVA	: Analysis of Variance
ARCO	: Association Research Circulation Osseous
Ark	: Arkadaşları
AVN	: Avasküler Nekroz
BADABEM	: Bağcılar Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deneysel Araştırma ve Beceri Geliştirme Merkezi
BALP	: Bone-alkaline phosphatase
Bcl-2	: B-cell lymphoma 2
BMD	: Kemik mineral yoğunluğu
BMP	: Kemik morfojenik protein
BV/TV	: Kemik hacmi/Total Hacim
BS/BV	: Kemik yüzey alanı/Kemik hacmi
BS/TV	: Kemik yüzey alanı/Total hacim
CA	: Kaliforniya eyaleti
CD31	: Yüzey farklılaşma antijeni 31
COX	: Siklooksijenaz
CTX	: Carboxy-terminal tip 1 collagen crosslink
DAB	: 3,3'-Diaminobenzidine
DHTQ	: Dihidrotimokinon
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonukleik asit

ESWT	: Extracorporeal Shock Wave Therapy
ELISA	: Enzym-linked immunosorbent assay
FBON	: Femur başı osteonekroz
GSH	: Glutatyon
HCl	: Hidroklorür
HDL	: High density lipoprotein
H+E	: Hematoksilen + Eozin
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
IFN-γ	: İnterferon gama
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
IP	: İntraperitoneal
IL-1β	: İnterlökin-1 beta
IL-6	: İnterlökin-6
IL-10	: İnterlökin-10
LDL	: Low density lipoprotein
LPS	: Lipopolisakkarit
LO	: Lipoksijenaz
Mikro BT	: Mikro bilgisayarlı tomografi
MDA	: Malondialdehid
MFSA	: Medial Femoral Sirkumfleks Arter
MPS	: Metil Prednizolon Sodyum Süksinat
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme

MO	: Missouri eyaleti
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NF-κB	: Nükleer faktör kappa beta
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
NS	: Nigella Sativa
ON	: Osteonekroz
OPG	: Osteoprotegerin
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PDGF	: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PECAM	: Platelet/endotelyal hücre adezyon molekülü
PGE2	: Prostaglandin E2
RANKL	: NF-κB ligand reseptör aktivatörü
ROI	: Region of Interest
SLE	: Sistemik Lupus Eritematozum
SPECT	: Tek foton emisyonlu bilgisayarlı tomografi
TAS	: Toplam antioksidan kapasite
Tb. Th	: Trabeküler kalınlık
Tb. N	: Trabeküler sayı
Tb. Pf	: Trabeküler kemik modeli faktörü
Tr. Sp	: Trabeküler mesafe

Tr. Sep	: Trabeküler parçalanma
TC	: Total kolesterol
TETLAB	: İstanbul Üniversitesi Tıbbi ve Endüstriyel Tasarım Laboratuvarı
TG	: Trigliserid
TKA	: Total kalça artroplastisi
TQ	: Thymoquinone, Timokinon
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör α
USA	: Amerika Birleşik Devletleri
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
8-OHdG	: 8-hidroksi-20-deoksiguanosine
3R	: Replacement, Reduction, Refinement

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1 Femur Başı Osteonekrozunun Sekonder Sebepleri	20
Tablo 2.2 Ficat ve Arlet Sınıflaması	31
Tablo 2.3 Femur başı osteonekrozu için ek sınıflamalar	32
Tablo 3.1 Deney hayvanlarının gruplara göre dağılımı	46
Tablo 4.1 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinin radyolojik bulgularının gruplara göre (n=6) dağılımı ve istatistiksel karşılaştırılması	64
Tablo 4.2 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinin histopatolojik değerlendirmelerinin gruplara göre (n=6) dağılımı ve istatistiksel karşılaştırılması ..	69
Tablo 4.3 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinde oksidatif hasarın ve lipid peroksidasyonun immunohistokimyasal seviyeleri ve gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırılması	73
Tablo 4.4 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinde apoptozun immunohistokimyasal düzeyleri ve gruplar arasında istatistiksel karşılaştırılması ...	76
Tablo 4.5 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinde apoptozun immunohistokimyasal düzeyleri ve gruplar arasında istatistiksel karşılaştırılması ...	79
Tablo 4.6 Femur başı osteonekroz modelinde serum malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) düzeyleri ve gruplara göre karşılaştırılması	81
Tablo 4.7 Femur başı osteonekroz modelinde serum kemik alkalın fosfataz (BALP), karboksi-terminal tip 1 kollajen çapraz bağ (CTX-1), osteoprotegerin (OPG) düzeyleri ve gruplara göre karşılaştırılması	83
Tablo 4.8 Femur başı osteonekroz modelinde serum trigliserid (TG), total kolesterol (TC), HDL kolesterol, LDL kolesterol düzeyleri ve gruplara göre karşılaştırılması.	85

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 İnsan embriyolarında uzuv tomurcuklarının gelişimi	4
Şekil 2.2 Kalça eklem anatomisi.....	7
Şekil 2.3 Sağ asetabulumun posterolateral görünümü	10
Şekil 2.4 İliopsoas kasları ile kalçanın ön kapsülü arasındaki yakın ilişkiyi gösteren femur boynu seviyesindeki kadaverik sağ kalçanın enine kesiti	13
Şekil 2.5 Femur başı ve boynunun damarsal beslenmesi.....	15
Şekil 2.6 Manyetik Rezonans Anjiyografi	16
Şekil 2.7 Femur başı kesitinde osteonekroz ve subkondral çökme.....	18
Şekil 2.8 Osteonekrozun muhtemel patogenezi	21
Şekil 2.9 Epifizyal arterlerin orijini ve yolunun şematik gösterimi ⁴⁸	22
Şekil 2.10 Evre III Femur Başı Osteonekrozunda ‘crescent sign’	27
Şekil 2.11 Sol femur başında (a) ve sağ femur başında (b) fovea kapitalis	29
Şekil 2.12 MRG’de sol femur başında idiyopatik geçici kalça osteoporozuna ait sinyal değişikliği.....	30
Şekil 2.13 MRG taramalarından kombine nekrotik açının hesaplanması.....	33
Şekil 2.14 FBON olan hastaların yönetimi ve tedavisi için algoritma.....	35
Şekil 2.15 FBON sonrası femur başı kollapsında total kalça protezi uygulaması.....	38
Şekil 2.16 Thymoquinone (2-Isopropyl-5-methyl-1,4-benzoquinone) ⁸¹	39
Şekil 2.17 Nigella Sativa bitkisi.....	40
Şekil 3.1 FBON modeli oluşturma protokolü	45
Şekil 3.2 Sıçana orogastrik lavaj yolu ile Timokinon uygulaması.....	48
Şekil 3.3 Gazlı beze sarılan femur kemiği	49
Şekil 3.4 BADABEM Operasyon Salonu -1 görünümü	50
Şekil 3.5 Sıçan intrakardiyak kan alma işlemi görüntüsü	50
Şekil 3.6 Sıçan sakrifikasyon sonrası cerrahi işlem öncesi görünüm	51
Şekil 3.7 Kontrol grubundan bir sıçanda FBON gelişmemiş femurun çıkarma işlemi sonrası görünümü	52
Şekil 3.8 AVN grubu bir sıçanın FBON gelişmiş femur başının, femur çıkarma işlemi sonrası görünümü	53
Şekil 3.9 Radyolojik inceleme için kullanılan mikro BT cihazı	54
Şekil 3.10 Ham görüntü ve kesit görüntüsü	55

Şekil 3.11 Kesik diş etrafında ROI (Region of Interest) belirlenmesi	56
Şekil 3.12 İlgili alan için eşik değeri (threshold) belirlenmesi	56
Şekil 3.13 Mikro-BT görüntüleme bulgularının gruplara göre 3 boyutlu görselleri..	57
Şekil 4.1 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinin ışık mikroskopik görüntüleri. Hematoksilen + Eozin, 40x ve 100x.	66
Şekil 4.2 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinin ışık mikroskopik görüntülerinde histomorfometrik ölçümlere örnekler. Trabekül çevresi ve trabekül hacmi ölçümü.	67
Şekil 4.3 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinin histomorfometrik bulgularından kemik hacminin doku hacmine oranlarının (%BV/TV) karşılaştırılması (P = 0,0026).....	70
Şekil 4.4 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinin histomorfometrik bulgularından trabeküler kemik çevresinin toplam hacme oranlarının (BS/TV, mm ² /mm ³) karşılaştırılması (P = 0,342)	71
Şekil 4.5 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinin histomorfometrik bulgularından trabeküler kemik çevresinin kemik hacmine oranının (BS/BV, mm ² /mm ³) karşılaştırılması (P = 0,339).....	71
Şekil 4.6 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinin histomorfometrik bulgularından trabeküler kalınlıkların (Tb.Th, µm) karşılaştırılması (P = 0,366).	72
Şekil 4.7 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinin histomorfometrik bulgularından trabeküler sayıların (Tb.N, mm ⁻¹) karşılaştırılması (P = 0,326).....	72
Şekil 4.8 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinin 8-OHdG (8-hidroksi-20-deoksiguanosine) ve MDA (Malondialdehide) immunohistokimya analizlerinin ışık mikroskopik görüntüleri. 200x.	74
Şekil 4.9 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinin 8-OHdG (8-hidroksi-20-deoksiguanosine) ve MDA (Malondialdehide) immunoreaktivitelerinin değerlendirilmesi ve gruplara göre istatistiksel olarak karşılaştırılması	75
Şekil 4.10 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinin Bcl-2 ve Caspase-3 immunohistokimya analizlerinin ışık mikroskopik görüntüleri. 200x	77
Şekil 4.11 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinin Bcl-2 ve caspase-3 immunoreaktivitelerinin değerlendirilmesi ve gruplara göre istatistiksel olarak karşılaştırılması	78

Şekil 4.12 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinin PECAM/CD31 ve VEGF immunoreaktivitelerinin değerlendirilmesi ve gruplara göre istatistiksel olarak karşılaştırılması	79
Şekil 4.13 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinin PECAM/CD31 (Platelet/endotelyal hücre adezyon molekülü 1) ve VEGF (Vasküler endotelyal büyüme faktörü) immunohistokimya analizlerinin ışık mikroskopik görüntüleri. 200x	80
Şekil 4.14 Femur başı osteonekroz modelinde serum malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) düzeylerinin değerlendirilmesi ve gruplara göre istatistiksel olarak karşılaştırılması	82
Şekil 4.15 Femur başı osteonekroz modelinde serum karboksi-terminal tip 1 kollajen çapraz bağ (CTX-1) düzeyinin değerlendirilmesi ve gruplara göre istatistiksel olarak karşılaştırılması	84

ÖZET

Amaç: Timokinon (TQ), *Nigella Sativa* (Çörek otu) bitkisinden izole edilmiş aktif bir bileşendir. Bu tez çalışmasında sıçanlarda steroid ile indüklenmiş femur başı osteonekroz (FBON) modelinde, TQ tedavisinin antioksidan, anti-apoptotik, osteoblastik ve hipolipidemik etkilerinin radyolojik, biyokimyasal, histopatolojik, histomorfometrik ve immunohistokimyasal açıdan değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Toplam 24 adet Sprague-Dawley cinsi genç-erişkin erkek sıçan randomize olarak dört gruba ayrıldı. Kontrol grubuna dört hafta süresince oral yoldan salin solüsyonu verildi. TQ grubuna dört hafta oral TQ (10 mg/kg/gün) uygulandı. LPS/MPS ve LPS/MPS+TQ grubunda FBON modeli için Lipopolisakkarit (LPS) (20 µg/kg) ve Metilprednizolon (MPS) (40 mg/kg) enjeksiyonları uygulandı. LPS/MPS+TQ grubunda FBON indüklenmesi ile beraber her gün ve günde bir kez oral TQ (10 mg/kg/gün) uygulandı. Tüm sıçanlara dördüncü haftanın sonunda genel anestezi altında intrakardiyak kan alma ve sakrifikasyon işlemi uygulandı ve sağ femurları cerrahi olarak çıkartıldı. Ayrılan serumlarda biyokimyasal inceleme için ELISA yöntemi ile ölçüm yapıldı. Çıkarılan tüm kemik dokularına mikro-BT görüntülemesi yapıldı. Ardından femur başı kemik dokularına histopatolojik, histomorfometrik ve immunohistokimyasal incelemeler yapıldı.

Bulgular: Mikro-BT değerlendirmesinde LPS/MPS+TQ grubunda; LPS/MPS grubuna göre daha yüksek BMD, daha düşük porozite, Tr. Sp ve Tr. Sep verileri elde edildi. Histopatolojik incelemede osteonekroz; LPS/MPS grubunda diğer gruplara kıyasla anlamlı derecede artarken, LPS/MPS+TQ grubunda anlamlı derecede düştüğü tespit edildi ($P = 0,0077$). LPS/MPS grubunda kemik iliğinin normal morfolojisini kaybettiği, hematopoetik hücrelerin sayısının azaldığı görüldü. Bunlara nekroz ve hemorajinin eşlik ettiği ve bazılarında trombus varlığı belirlendi. LPS/MPS+TQ grubunda kemik iliğinin normal morfolojisini koruduğu, hematopoetik hücre sayısının arttığı görüldü. Histomorfometrik incelemede LPS/MPS grubunda BV/TV yüzdesi, kontrol ve diğer gruplara kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu (sırasıyla $P<0,01$ ve $P<0,05$), LPS/MPS+TQ grubunda ise normal oranlara ulaştığı tespit edildi. İmmünohistokimyasal incelemede LPS/MPS grubunda 8-OHdG immünoreaktivitesinin arttığını ve TQ' nun bu hasarı dokunun tüm bölümlerinde

neredeyse tamamen iyileştirdiğini tespit edildi. Dokuda MDA düzeylerinin LPS/MPS grubunda arttığı ve LPS/MPS+TQ grubunda anlamlı olarak gerilediği fakat kontrol grubu düzeylerine ulaşamadığı tespit edildi. Bcl-2 immunoreaktiviteleri LPS/MPS uygulanan sıçanların dokularında düşük olduğu buna karşın TQ tedavisiyle arttırdığı belirlendi. LPS/MPS grubunun caspase-3 immunoreaktivitelerinin anlamlı düzeyde arttığı ve LPS/MPS+TQ grubunda kontrol seviyelerine gerilediği görüldü. VEGF immunoreaktivitelerinin LPS/MPS grubunda düşerken tedavi grubunda neredeyse normal düzeylerine ulaştığı belirlendi. Serum biyokimyasal incelemesinde MDA düzeyleri LPS/MPS+TQ grubunda, LPS/MPS grubunun serum düzeylerine kıyasla anlamlı derecede ($P<0,01$) düştüğü tespit edildi. Serum GSH düzeyleri FBON modelinde anlamlı derecede düştüğü ve TQ tedavisiyle bu düzeylerin anlamlı olarak arttığı görüldü($P<0,01$). LPS/MPS grubunun kemik rezorpsiyon belirteci olan serum CTX seviyesi anlamlı derecede yüksek bulunurken; tedavi gruplarında kontrol seviyesine geriledi. TQ uygulamasının LPS/MPS ile indüklenen HDL kolesterol düşüşü ve LDL kolesterol yükselişini anlamlı derecede düzelterek normal seviyelere yaklaştırdığı belirlendi.

Sonuç: Tüm verilerimiz sıçanlarda oluşturulan FBON modelinde LPS ve steroid kaynaklı DNA oksidatif ve lipit peroksidatif hasarın bir sonucu olarak ortaya çıkan vasküler ve hematopoetik hücre hasarlarının TQ uygulanmasıyla başarılı bir şekilde azaltılabileceği gösterildi. Bu antioksidan ve apoptoz önleyici etki; erken evre osteonekroz için umut verici bir tedavi olabilir.

Anahtar kelimeler: Timokinon, femur başı osteonekroz, metilprednizolon, lipopolisakkarit

ABSTRACT

Aim: Thymoquinone (TQ) is an active ingredient isolated from the *Nigella Sativa* (*Nigella*) plant. In this thesis study, it was aimed to evaluate the antioxidant, anti-apoptotic, osteoblastic and hypolipidemic effects of TQ therapy on the steroid-induced osteonecrosis of the femoral head (ONFH) model in rats in terms of radiological, biochemical, histopathological, histomorphometric and immunohistochemical aspects.

Materials and Methods: A total of 24 Sprague-Dawley young-adult male rats were randomly divided into four groups. Saline solution was administered orally to the control group for four weeks. TQ group was administered TQ (10 mg / kg / day) orally for four weeks. Lipopolysaccharide (LPS) (20 µg / kg) and Methylprednisolone (MPS) (40 mg / kg) injections were applied to establish ONFH model in LPS / MPS and LPS / MPS + TQ groups. After the establishment of ONFH in LPS / MPS + TQ group, oral TQ (10 mg / kg / day) was administered once daily. All rats underwent an intracardiac blood collection and sacrificed under general anesthesia at the end of fourth week, and right femurs were surgically removed. Analysis was carried out by ELISA method for biochemical examination in the serum. Micro-CT imaging was performed on all bone tissues removed. Then, histopathological, histomorphometric and immunohistochemical examinations were performed on the paraffin sections of femoral head.

Results: In micro-CT evaluation, a higher BMD and lower porosity, Tr. Sp and Tr. Sep data were detected in LPS / MPS + TQ group compared to LPS / MPS group. In histopathological examination, it was found that osteonecrosis increased significantly in LPS / MPS group compared to other groups but decreased in LPS / MPS + TQ group ($P = 0.0077$). The bone marrow was observed to lose its normal morphology, and the number of hematopoietic cells decreased in LPS / MPS group. These were accompanied by necrosis and hemorrhage, and the thrombus was determined in some of rats. In LPS / MPS + TQ group, it was observed that the bone marrow preserved its normal morphology and the number of hematopoietic cells increased. Histomorphometric examination revealed that the percentage of BV / TV in LPS / MPS group was significantly lower compared to the control and other groups

($P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively), while reached normal rates in LPS / MPS + TQ group. Immunohistochemical examination revealed that 8-OHdG immunoreactivity increased in LPS / MPS group and TQ almost completely healed this damage in all parts of tissue. It was determined that MDA levels in tissue increased in LPS / MPS group and decreased significantly in LPS / MPS + TQ group but could not reach the control levels. Bcl-2 immunoreactivity was low in the tissues of LPS / MPS treated rats but increased by TQ treatment. Caspase-3 immunoreactivity of LPS / MPS group increased significantly while decreased to control levels in LPS / MPS + TQ group. It was determined that VEGF immunoreactivity decreased in LPS / MPS group but reached almost to normal levels in the treatment group. In serum biochemical examination, MDA levels was found to reduce significantly ($P < 0.01$) in LPS / MPS + TQ group compared to the serum levels of LPS / MPS group. Serum GSH levels was observed to reduce significantly in the ONFH model and these levels elevated significantly with TQ treatment ($P < 0.01$). While the serum CTX level, which is the bone resorption marker, was found significantly higher in LPS / MPS group but decreased to the control level in treatment groups. It was determined that TQ application significantly improved the LPS / MPS-induced HDL cholesterol decrease and LDL cholesterol elevation by approximating to the normal levels.

Conclusion: All of our data showed that the vascular and hematopoietic cell damages that occur as a result of steroid-induced DNA oxidative and lipid peroxidative damages in the ONFH model established in rats can be successfully ameliorated by TQ administration. This antioxidant and anti-apoptosis effects of TQ may be a promising treatment option for early stage of osteonecrosis.

Key words: Thymoquinone, osteonecrosis of femoral head, methylprednisolone, lipopolysaccharide

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Aynı zamanda avasküler nekroz veya aseptik nekroz olarak da tanımlanan osteonekroz (ON), travmatik veya travmatik olmayan bir kaynaktan kemiğe kan akışının bozulmasını izleyen kemik hücresi ölümü olarak tanımlanır.¹ Osteonekroza neden olan birçok etiyolojik faktörü vardır. Glukokortikoidlerin (steroidlerin) kullanımı ve aşırı alkol alımı, atravmatik vakaların %80' inden fazlası ile ilişkilidir.² Steroidler, sistemik lupus eritematozus gibi kronik otoimmün hastalıkların tedavisinde, travmatik omurilik hasarı ve beyin hasarı gibi akut tıbbi durumlarda ve organ nakli sonrası immün baskılama için yaygın olarak kullanılmaktadır.³⁻⁵

Genç erişkinlerde femur başı osteonekrozu (FBON), femur başında çökmenin sık görülmesi ve kalça eklemine fonksiyon kaybına ve yaşam kalitesinin düşmesine neden olması nedeniyle zor bir hastalık olmuştur.⁶ İyatrojenik yönleri olabilen steroid kaynaklı FBON, ergenlerde ve orta yaşlı hastalarda sık görülür dolayısıyla tanı ve tedaviyi standartlaştırmak ve son derece güvenilir önleme yöntemleri geliştirmek gerekir.⁶ Hastalıkta erken tanı, esasen genç ve orta yaşlı nüfusu etkilediği için kritiktir ve hastalığın femur başının çökmesine doğru ilerlemesi, eğer tedavi edilmezse hastaların % 80' inde görülür.⁷ Kemik hücrelerindeki nekroz sürecini engellemek mümkün olmadığından hastalığın tedavisi oldukça zor ve sorunludur. Hastalığın doğal gidişinde herhangi bir müdahalede bulunmazsa olguların büyük çoğunluğunda progresyon, bunun sonucunda femur başının çökmesi ve eklem artrozu görülür.

Steroide bağlı osteonekrozun kemikteki iskemi nedeniyle geliştiğinin ileri sürülmesine karşın, kortikosteroid kullanımının osteonekrozun gelişimindeki ayrıntılı mekanizması belirsizdir. Bazı çalışmalar, steroid kaynaklı ON'un olası etiyolojik nedenleri gibi hem hiperkoagülasyon hem de hipofibrinolize yatkın olan trombotik ve fibrinolitik bozuklukları önermiştir⁸. Ekstravasküler lipid birikimi ve daha sonra artmış intraosseöz basınç da steroid kaynaklı ON'un gelişmesinde önemli bir neden olarak kabul edildi⁹. Hiperkoagülasyonu artırabilen vasküler endotelial disfonksiyon, steroid kaynaklı ON'un patofizyolojisinde de yer almıştır. Son zamanlardaki çalışmalarda, in vivo oksidatif stresin de steroide bağlı osteonekrozun patogenezinde önemli rol oynadığı bildirilmektedir.¹⁰

Timokinon, *Nigella Sativa* (Çörek otu) bitkisinden izole edilmiş aktif bir bileşendir.¹¹ Doğal olarak türetilmiş bir madde olarak timokinon (Thymoquinone, TQ) son zamanlarda özel bir ilgi görmüştür ve terapötik özellikleri için kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır.¹² Timokinon (TQ)'un, antioksidan ve antienflamatuar özelliklerin¹³ yanı sıra osteoklast sayısını azalttığı¹⁴ ve osteoblastik aktiviteyi arttırdığı¹⁴, lipit düşürücü¹⁵ etkileri de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir.

Güncel tedavi araştırmalarında birincil amaç hastanın herhangi bir nedenle steroid yapıda ilaç kullanımından sonra osteonekroz gelişimini engellemektir. Bu amaç için antikoagülan ajanlar, antilipidemik ajanlar ve antioksidan ajanlarla farklı tedaviler de önerilmiştir.^{16,17}

Bu tez çalışmasında; genç erişkin erkek cins sıçanlarda steroid ile indüklenmiş femur başı osteonekroz modelinde, timokinon (TQ) tedavisinin antioksidan, antiosteoklastik, osteoblastik ve hipolipidemik etkilerinden faydalanarak etkinliğinin değerlendirilmesi, TQ tedavisinden fayda görüp görmediğini tespit etmek amaçlanmıştır.

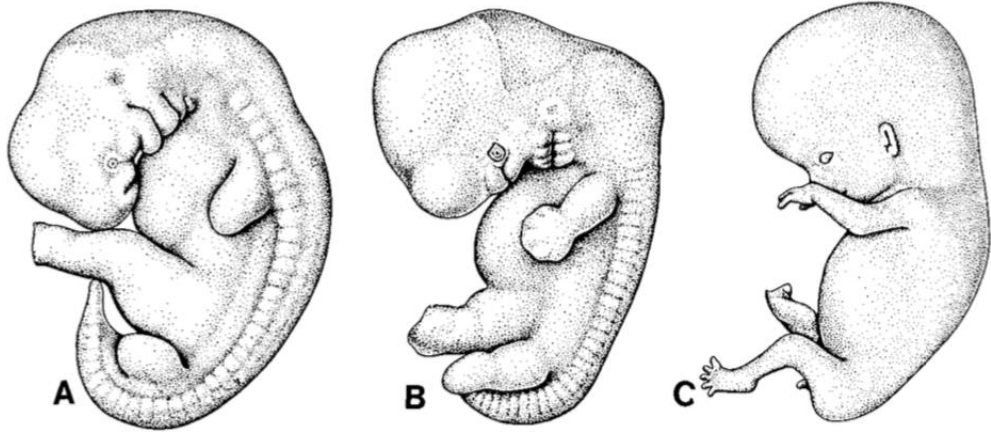
Hastalığın erken yaşta başlaması ve hastaların genç yaşlarda kalça artroplasti ameliyatına ve bunun getirdiği sonuçlara neden olacaktır. Uygun zamanda timokinon (TQ) tedavisi gibi invaziv olmayan bir tedavi yöntemi hayat kalitesini arttırmak için faydalı olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KALÇA EKLEMİ EMBRİYOLOJİSİ

Normal kalça gelişimi, asetabulum, femur başı, kalçanın eklem içi yapıları ve kalça eklemine kan temini oluşturmak üzere uyum içinde hareket eden, özenle düzenlenmiş bir doğum öncesi olaylar dizisinin sonucudur. Doğumdan sonra kalça eklemi olgunlaşmamış olarak kalır ve femur başı ile asetabulum arasındaki yakın ilişki, uygun postnatal gelişim için çok önemlidir. Bu bölüm normal kalça embriyolojisini ve postnatal patolojinin bazılarını olgun erişkin kalçanın nihai şeklini ve hareketini etkileyebilecek şekilde açıklayacaktır.

İntrauterin yaşam üç evreye ayrılır; blastosist, embriyonik ve fetal. Blastosist fazı, fertilizasyondan sonraki ilk iki hafta içinde ovumun endometriuma implante olduğu dönemdir. Blastosistin ardından, embriyonik faz gelir; primer doku farklılaşması süresi 2-8. haftalar arasındadır. Bu embriyonik faz sırasında, tüm kas-iskelet sistemi aşağıdaki şekillerde gelişir; hem üst hem de alt ekstremité tomurcukları (Şekil 2.1), kemikli uzuvların kıkırdak anlağı ile birlikte ortaya çıkar; eklemler, boyuna büyüme plakaları ve kemiklere damar desteğı oluşur; ve sonuçta, karmaşık eklemler insan hareketlilik sistemi tamamen farklılaştırılmış ve oluşturulmuştur. Gelişim kraniokaudal yönde olur. Bu evrede etkili olan vasküler problemler, sınırlandırıcı patoloji ve teratojenler, sağlıklı fonksiyonel simetrik alt ekstremité gelişimini engelleme olasılığına sahiptir.



Şekil 2.1 İnsan embriyolarında uzuv tomurcuklarının gelişimi.

A. 5 hafta, B. 6 hafta, C. 8 hafta, Arka bacak tomurcukları, ön ayaklarınkinden daha az gelişmiştir.¹⁸

Sekizinci haftadan doğuma kadar fetal faz, vasküler desteğin iyileştirilmesi, uzun kemiklerin diyafizinin ossifikasyonundan ve eklem içi yapıların oluşumundan oluşur.¹⁸

Kalça eklemi, ilkel bacak tomurcuğunun mezenşiminde bir yarık görüldüğünde, yaklaşık olarak yedinci gebelik haftasında gelişmeye başlar. Bu doğum öncesi hücreler, onbirinci gebelik haftasıyla tam olarak oluşturulmuş bir kıkırdaklı femoral baş ve asetabulumu ayrılır.¹⁹

Yenidoğan asetabulumu, labrum adı verilen ince bir fibrokartilaj kenarı ile tamamen kıkırdaktan oluşur. Asetabulumun hyalin kıkırdağı, pelvisin üç kemik bileşenini (yani ilium, isciium ve pubis) bölen ve birbirine bağlayan triradiat kıkırdakları ile sürekli dir.¹⁹ Asetabulum femura paralel olarak gelişir. İliumda 9. haftada, iskiumda 4. ayda ve pubisde 5. ay içinde kemikleşme merkezleri oluşmaya başlar.

Yenidoğanda üst femurun tamamı femur başı ve büyük ve küçük trokanterler şeklinde bir kıkırdak yapıdadır. Femurun proksimal segmentinin gelişimi, kıkırdaklı üst femur ve femur shaftının birleşme yerindeki bir apofizyel ve epifizyel büyümenin bir kombinasyonu ile meydana gelir. Normal femurda femur başı ortasında doğum

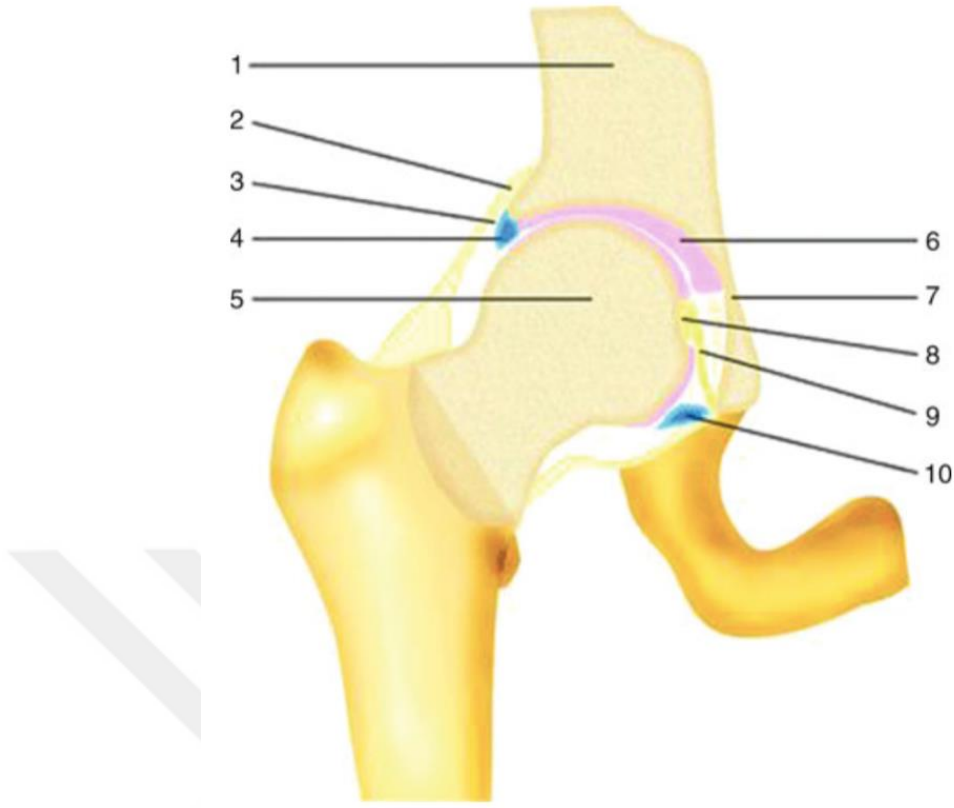
sonrası yaşamın dördüncü ve yedinci ayları arasında bir kemikleşme merkezi belirir. Bu merkez geç ergenlik döneminde fiziksel olarak kapanana kadar büyür; bu zaman boyunca, yetişkin femur başı haline gelir ve ince bir eklem kıkırdak tabakası ile kaplanır.¹⁹

Kalça eklemi kapsülü, ligamentum teres, labrum, transvers asetabular ligaman ve kas dokularının oluşumu fetal dönemde onaltıncı haftada tamamlanır. Kalçanın fetal postürü; fleksiyon, addüksiyon ve dış rotasyondur. Bu pozisyon kalça eklemine en stabil olduğu durumdur.

2.2. KALÇA EKLEMİ ANATOMİSİ

Kemik, ligamentöz, kas ve nörovasküler yapılar arasındaki anatomik ilişkilerin bilinmesi kalça eklemi patolojisinin cerrahi ve cerrahi dışı tedavileri için büyük öneme sahiptir. Bu bölüm kalça eklemine kemiksel, kapsüler, ligamentöz, kas dokuları ve nörovasküler yapıların anatomilerini, klinik olarak en fazla ilgisi olan yapılara özel dikkat göstererek gözden geçirilecektir. Kalça eklemi; femur başı ve asetabulum birleşimi ile oluşan top ve soket tipi bir sinovyal eklemdir. Bu nedenle, omuz eklemine benzer üçlü hareket hareketi için potansiyele sahiptir, ancak kalça temel olarak kapalı kinematik zincir hareketlerinde, örneğin yürüme yürüyüşünde işlev gördüğünden dolayı, bu ekleme mevcut hareketliliği hafifletmektedir. Kalça eklemine kapsülü, eklem stabilitesini sağlar ve içsel kapsüler bağların varlığı ile güçlendirilir. Labrum ve ligamentum teres gibi eklem içi yapılar da işlevini etkileyen kalça eklemi anatomisinin elemanlarıdır. Kalça eklemine kas yapısı, kalçanın hem hareketliliğine hem de stabilitesine katkıda bulunur ve bölgesel olarak gluteal kaslara ve anterior, medial ve posterior uyluk kaslarına bölünebilir. Kalça eklemine innervasyon, eklemi geçen sinirler tarafından sağlanır. Klasik olarak obturator sinir, kalçaya inervasyonun birincil kaynağı olarak kabul edilir; ancak, femoral ve siyatik sinirlerin dalları da duyuşal innervasyonuna katkıda bulunur. Kalça eklemi için primer kan dolaşımı kaynağı, femoral ve gluteal damarlardan ek katkılar sağlayan medial femoral sirkumfleks arterdir. Asetabulumun kendisi üç leğen kemiği, ilium, ischium ve pubis birleşimi ile oluşur. Kalça eklemine merkezi, inguinal ligamanın üçte birine distalinde

yaklaşık 1-2 cm uzanır. Kemikli bir soket olarak tanımlanmakla birlikte, asetabulum, alt kısmında bir boşluk bulunan, eksik bir küredir (Şekil 2.2). Bu boşluk, eklemlenmenin bütünlüğünü korumaya yardımcı olan transverse asetabular ligament ile kaplıdır. Asetabular labrum, eklem kapsülü, kapsül ligamentleri ve kalça eklem kas sistemi, bu eklem bütünlüğünün korunmasında rol oynamaktadır. Kalça eklemi aralığı hareketindeki bireysel değişkenlik, bu anatomik bileşenlerin herhangi birindeki bireysel farklılıkların bir sonucu olabilir. Kalça eklem bilye ve soket mimarisi sagittal, koronal ve horizontal / transverse düzlemlerde triplanar harekete izin verir. Asetabulum ile femur başı arasında meydana gelen eklem artrokinematik hareketleri, asetabulumda femur başının dönmesini ve kaymasını içerir. Sonuçta ortaya çıkan osteokinematik hareketler sagittal düzlemde fleksiyon ve ekstansiyon, koronal düzlemde abduksiyon ve adduksiyon ve horizontal / transverse düzlemde medial (iç) veya lateral (dış) rotasyondur. Fleksiyon ve ekstansiyon sırasında, sırasıyla femur başının hafif bir posterior veya anterior kayması ile birlikte asetabulum üzerinde femur başı dönüşü vardır. Abduksiyon sırasında femur başı asetabulumda aşağı doğru kayar. Son olarak, asetabulum üzerindeki femur başının ön veya arka kayması, sırasıyla dış veya iç rotasyon sırasında eklem yüzeylerinde meydana gelir. Ortalama aktif hareket aralığı 90 derecelik diz fleksiyonu ile, oturma pozisyonunda ölçüldüğünde; sagittal düzlemde yaklaşık 120 derece fleksiyon ve 20 derece ekstansiyon, ön düzlemde 40 derece abduksiyon ve yatayda 30 derecelik iç ve dış rotasyon aralığıdır.²⁰ Yaş değişkeni olarak incelendiğinde, en genç ve en yaşlı bireyler arasındaki hareket aralığındaki değişiklikler küçüktür ve yaşlı bireylerde, gençlere kıyasla hareket aralığında % 20'lik bir düşüş gözlemlenen kalça ekstansiyonu hariç, klinik önemi çok azdır.²⁰ Kalçanın en yüksek stabilitesini sağlayan kapalı paketlenmiş pozisyonu, ekstansiyonda iken bir miktar iç rotasyon ve abduksiyon pozisyonudur. Bu pozisyonda, eklem yüzeyleri maksimum derecede, tamamen olmasa da uyumludur.



Şekil 2.2 Kalça eklem anatomisi

(1) Ilium, (2) eklem kapsülü, (3) perilabral recess, (4) asetabuler labrum, (5) femur başı, (6) eklem kıkırdağı, (7) asetabulum, (8) fovea, (9) ligamentum teres, (10) transvers asetabular ligaman (http://www.springerimages.com/Images/MedicineAndPublicHealth/1-10.1007_s13244-010-0023-x-1)

2.2.1 Kemiksel, Dizilimsel, Kapsüler ve Ligamentöz Anatomi

Proksimal femur ve asetabulumun morfolojisinde önemli değişkenlik vardır. Femoral ve asetabular dizilimin spesifik yönleri, önemli klinik uygunluğa ve eklem biyomekaniğine etki eder. Hem eğim açısı hem de femoral torsiyon miktarı, kalça ekleminin işlevini etkileyen femoral anatomi özellikleridir. İnklınasyon açısı veya collodiafizer açı, femur milinin eksenine göre femur başının ve boynunun eksenini tarafından oluşturulur. Normal açı yaklaşık 125 derecedir. Collodiafizer açı; femoral offsetin boyutunu belirler, yani femur başının dönme merkezinden femurun uzun eksenini ikiye bölen bir çizgiye olan mesafeyi belirler. Femurun collodiafizer açısı ve sonuçta ortaya çıkan femoral offset kalça abduktörlerinin mekanik avantajını etkiler.

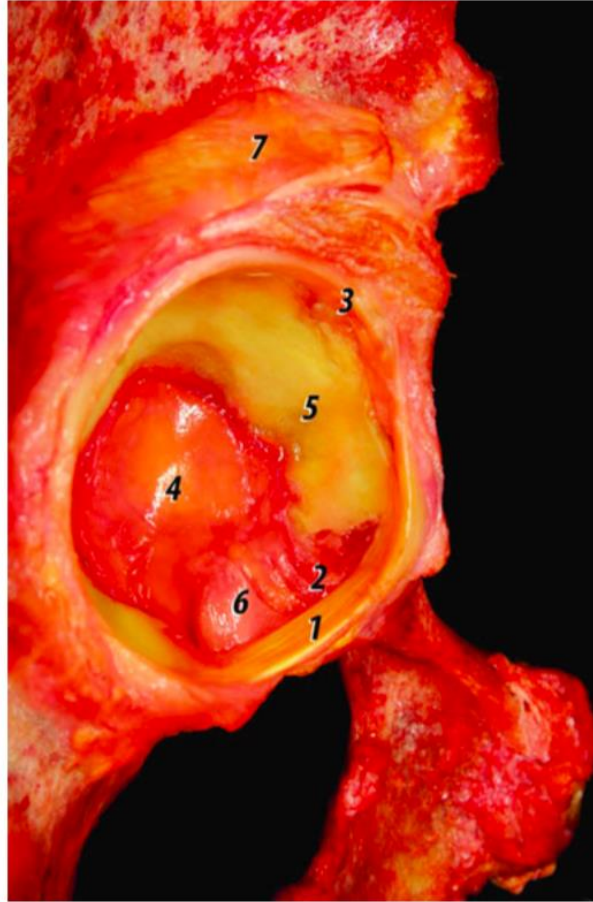
Azalan collodiafizer açılar (coxa vara), abdüktörlerin moment kolunu artırır ve asetabulumdaki femur başı örtünmesinin artması nedeniyle eklem stabilitesini artırır. Daha kısa, daha valgus femoral boyun, offseti azaltır ve daha büyük abdüktör kuvvetleri ve kalça ekleminde potansiyel olarak artan temas kuvvetleri gerektiren kalça abdüktörlerinin moment kolunu azaltır. Femoral versiyon (torsiyon), femur boyunun eksenini ile dizin transkondiler eksenini arasındaki açısal fark olarak tanımlanır ve yetişkinlikte normalde yaklaşık 15 derecedir. Anteversiyon, femoral torsiyon açısında bir artıştır. Femoral torsiyon açısında azalma retroversiyon olarak bilinir. Aşırı anteversiyon ve retroversiyon eklem eklem uyumsuzluğunu korumak için kalça ekleminde telafi edici rotasyon (sırasıyla medial ve lateral) gerektirir. Aşırı anteversiyon, gluteus mediusun momentini de değiştirebilir ve böylece verimini düşürebilir. Spesifik olarak, artmış femoral anteversiyon, trokanter majorü posteriora doğru yer değiştirir ve böylece gluteus mediusun kolunu ve ardından gücünü azaltır.²¹ Kalça temas kuvvetlerinin artmış femoral anteversiyon ile arttığı gösterilmiştir.²² Femur başının merkezini ve asetabulumun yan kenarını bağlayan çizginin oluşturduğu açı, merkezi kenar açısı olarak bilinen vertikal bir açı oluşturur, 25 dereceden daha büyük açılar normal kabul edilir. Bilgisayarlı tomografi kullanılarak proksimal femoral ve asetabüler dizilimin incelenmesi, bu ölçümler arasında ilişki olduğunu göstermiştir.²³ Ortalama femur boynu versiyonunun asetabular versiyon ile pozitif korelasyon gösterdiği bulundu.²³ Femoral versiyon ile asetabular eğim arasında negatif bir korelasyon bulundu.²³ Femur collodiafizer açısı, asetabular versiyon ile pozitif, yaş ile negatif korelasyon gösterdi.²³ Hem asetabular versiyon hem de merkezi kenar açısı, kadın cinsiyetiyle pozitif olarak korele bulundu.²³

Kalça ekleminin kapsülü, asetabulum ve proksimal femuru birleştiren yoğun liflerin, asetabular periosteuma sıkı proksimal ekleri ve distal ekleri femur önündeki intertrokanterik çizgiye bağlayan silindirik bir düzenlemeden oluşur.²⁴ Asetabulumun yetersiz kaldığı durumlarda kapsül transverse asetabular ligamana bağlanır.²⁴ Kapsülün kalınlığının değiştiği gözlemlenmiştir, ancak kapsüller bağlar ile kalıcı bir şekilde takviye edilmiştir. Anteriorda kapsüller ligamanların en güçlü olanı, iliofemoral ligament, kapsülü intertrokanterik çizgi ile asetabular rim ve antetroinferior iliak spine ilial kısmı arasında uzanan uzunlamasına yönlendirilmiş liflerle güçlendirir. Bu ligamanın rektus femoris kasının tendinöz orijini ile güçlendirildiği ileri

sürülmektedir.²⁴ İliofemoral ligament, seyri boyunca daha ince ve merkezi bir bölgeye sahip, daha ileri ve daha aşağı olarak iki ayrı kalınlaşmış şeride sahiptir. Lifleri uzamada maksimum gergin ve kalça fleksiyonunda gevşek görünür.²⁴ Kalça eklemine önündeki bu ligamanın konumu nedeniyle, dik duruşun korunmasında, vücudun durma sırasındaki femur üzerindeki kuvvetinin dengelenmesi için özel bir rolü olduğu öne sürülmüştür. Pubofemoral ligaman obturator kretindeki proksimal bağlanmasından ve üst pubik ramustan intertrokanterik fossaya uzanır. İschiofemoral ligament, asetabular rim ve labruma ve trokanter majörün iç yüzeyine bağlanır. Posterior olarak, ischiofemoral ligament eklem kapsülünü güçlendirir ve her ikisi de asetabular rim ve labrum ile trokanter majorün iç yüzeyi arasında eğik bir yönde uzanan iki bant (üst ve alt) şeklinde bölünebilir. Bu bağın, kalça eklemine bu hareketle liflerinin uzunluğu ve gerginliği nedeniyle iç rotasyonu kısıtladığı öne sürülmüştür.²⁴ Zona orbicularis, kalça eklemine halka şeklindeki bir bağ oluşturan çevresel bir fiber bantıdır. Labrum ve kapsül, ilişkili ligamentleri ve zona orbicularis ile distraksiyon sırasında kalça eklemine stabilite sağlar. Eklem kapsülünün stabilizatör olarak rolü, total kalça artroplastisinde özellikle önemli bir husustur, çünkü araştırmalarda, kapsülün eksikliği, artroplasti ameliyatından sonra primer olmasa da dislokasyonun bir nedeni olabilir.²⁵ Ligamentum teres, bir zamanlar kalça eklemine stabilizasyonunda veya biyomekanikte hiçbir rolü olmayan artakalan bir yapı olarak kabul edildi; ancak, bu bağın embriyonik bir kalıntıdan daha fazlası olduğu ve kalça eklemi mekaniğine ve patolojisine katkıda bulunabileceği gösterilmiştir.^{26,27} Insertio sahası, femur başındaki eklem kıkırdağından yoksun olan yuvarlak bir alan olan femur fovea kapitisine yerleşmiştir. Histolojik olarak, ligamentum teres, iyi düzenlenmiş tip I, III ve IV kollajen lif demetlerinden oluşur.²⁷ Kendi sinovyal zarı tarafından sarılmıştır.^{26,27} Obturator arterin arka bölümünün anterior bir dalı ligamentum teres boyunca ilerler, vaskülarize eder ve bu damarın variabl dalları femur başı içine uzanır. Bazı kişilerde bu dallar femur başı için bazı vasküler desteğe katkıda bulunabilirler.^{26,27}

Ayrıca kotiloid ligament olarak da adlandırılan asetabular labrum hem kemik asetabulum çevresi boyunca hem de eklem yüzeyine, asetabulumu kaplayan eklem kıkırdaklarına bağlantılar yoluyla bağlanan bir fibrokartilajen yapıdır (Şekil 2.3). Ayrıca labrumun anterior ve posterior transvers asetabular ligamanlara yapışıklıkları

vardır ve bu yapılar birlikte kalça ekleminin soketini tamamlar. Labrum esasen tip I kollajenden oluşur. Labrumun anterior liflerinin, asetabulumun kemikli kenarına paralel olarak bağlandıkları, onları kesme kuvvetlerine duyarlı hale getirirken, arka liflerin kemikli kenara dik olarak bağlandıkları, kesme gerilmelerine karşı koyma kabiliyetlerini arttırdıkları bildirilmektedir.²⁸ Labrum eklem kapsülünden kapsüler recess ile ayrılır. Labrum yüzüne bakıldığında at nalı şeklinde görünür; bununla birlikte, enine kesitte, labrum şeklinde üçgen şeklinde görünür.



Şekil 2.3 Sağ asetabulumun posterolateral görünümü

(1) Transverse asetabular ligaman (2) Asetabular notch. (3) Asetabular labrum. (4) Asetabular fossa. (5) Anterior lunat kıkırdak. (6) Ligamentum teres (rezeke edilmiş). (7) Rektus femoris kasının yansıyan başı (http://www.springerimages.com/Images/Medicine AndPublicHealth/1-10.1007_978-1-4419-7925-4_7-7)

2.2.2 Kalça Eklemine Muskuler Anatomisi

Kalça eklemine etkiyen kaslar, gluteal bölgedeki kasları ve uyluğun ön, medial ve arka kompartmanlarının kaslarını içerir. Bu bölüm, en büyük klinik öneme sahip olanlara özellikle dikkat ederek bu bölgesel kas gruplarının bağlanma yerlerini ve etkilerini gözden geçirecektir.

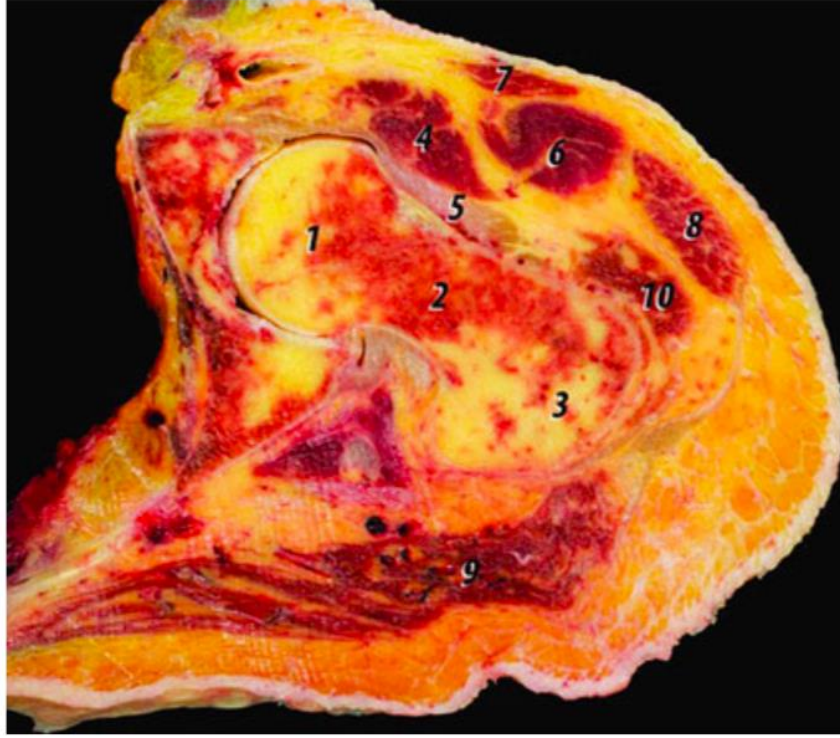
2.2.2.1 Gluteal bölge kasları:

Gluteal bölgede kaslar klasik olarak yüzeysel ve derin gruplara ayrılır. Yüzeysel grup gluteus maksimus, gluteus medius, gluteus minimus ve tensör fasya lata içerir. Bu grupta, gluteus maksimus en yüzeysel kastır ve gluteus medius fasyası, ilium, posterior superior iliyak spine'ın alt sınırı arasındaki torakolomber fasyadan kaynaklanır. Bu kasın çoğunluğu için insersiyon bölgesi, femurun trokanter majordeki aponeurotic kökenli iliotibial bant üzerindedir; bununla birlikte, kas fasiküllerinin alt üçte biri femurun gluteal tüberositine eklenir. Bu kas, birinci ve ikinci sakral spinal sinirlerin yanı sıra inferior gluteal sinirden innervasyon alır. Son dönemdeki literatür gluteus maksimus kasının klasik olarak bilinen kalça eklemi ekstansiyonuna ek olarak sakroiliak eklem stabilizasyonu ve gövde-alt ekstremité arasında yük transferinde yardımcı olduğunu göstermiştir.²⁹ Gluteus medius kası anterior ve posterior gluteal çizgiler arasındaki iliumdan orijin alır. Gluteal minimus kası klasik olarak anterior ve inferior gluteal çizgiler arasındaki iliumun dış yüzeyinden kaynaklandığı tanımlanmıştır. Anterior gluteal hat boyunca, gluteus minimus'un büyük siyatik çentiğe uzandığı ve posterior superior asetabulumu kaplamak için proksimal bir ataşmana sahip olduğu bildirilmiştir.³⁰ Gluteus medius ve minimusun femurun trokanter majorü üzerine yerleştirildiği kabul edilir, medius en sık trokanterin yan tarafına ve minimusun ön yüzeyine girdiği bildirilir.³⁰ Yüzeysel gluteal grubun son kası, tensor fasya lata, genellikle iliak krestinin anterolateral bölümünden ve SIA's'ın lateral yüzünden orijin alır. Bu kas distalde fasya lataya bağlanır, bu distal bağlanmanın nasıl gerçekleştiğine ilişkin farklı açıklamalar vardır. Özellikle tensör kasının tendonu hemen kas karnının altındaki iliotibial bantına girer veya bu liflerin kendileri aşağıya doğru devam ederek, Gerdy'nin tüberkülüne, tibia ve patellar retinakulumun yan tarafına eklenirler.³⁰ Gluteus medius ve minimus ve tensor fasya lataya inervasyon, superior gluteal sinir yoluyla yapılır. Gluteus medius ve minimus ve tensor fasya lata uyluğun abduktörleri olarak birincil bir işleve sahiptir, ayrıca klinik

ilişkilerin birçoğu, yürüme sırasında kapalı zincirdeki işlevleridir. Bunlar pelvisi stabilize eder ve kontralateral ekstremite uzuv ilerlemesi için sallanırken pelvik duruş fazında düşmesini önlerler. Kalça fleksiyonu pozisyonunda, gluteus medius ve minimus da uyluğun iç rotatörleri olarak işlev görür. Klasik olarak diğer gluteal kaslara göre daha az vurgulanırken, kadavra diseksiyonunun sonuçları, eklem kapsülüne yapışması göz önüne alındığında, gluteus minimusun potansiyel olarak önemli bir işlevi olduğunu göstermektedir. Gluteus minimusun kapsülü sıkılaştırarak ve femur başı üzerine baskı uygulayarak femur başını asetabulumdaki stabilize etmek olabileceği öne sürülmektedir.³¹ Derin gluteal kas grubu, altı kısa dış rotatörden oluşur: piriformis, üst ve alt gemellus kasları, obturator externus ve internus kasları ve quadratus femoris kası (Şekil 2.4). Piriformis kası önemli bir cerrahi landmarktır. Orijini, ikinciden dördüncüye doğru sakral omurların ön yüzeyinden başlar. Piriformis kasının anatomisinde en sık görülen varyant, siyatik sinir tarafından kas karnının superior ve inferior kısımlara bölünmesidir.³² Piriformisin distal bağlanma bölgesinin en sık trokanterik fossadan daha superior veya hem anterior hem de superiorda olduğu gözlenmiştir.³³ Piriformis kasının potansiyel olarak sadece kalçanın dış rotasyonunda değil, kalça eklemi fleksiyon yaparken femur başının posterior translasyonunu da kısıtlamada rol oynadığı öne sürülmektedir.³³

2.2.2.2 Uyluğun ön kompartman kasları:

Proksimalde, uyluğun ön kompartmanı sartorius, kuadriseps kasının rektus femoris kısmı, iliopsoas ve pektinus kaslarından oluşur (pektinus bazen medial uyluk kasının kasları olarak sınıflandırılır) (Şekil 2.4). Birlikte bu kaslar kalça eklemindeki uyluğun farklı derecelerde fleksiyonuna katkıda bulunur ve genel olarak femoral sinirinden dallar yoluyla primer olarak innervasyon alırlar. İstisna olarak iliopsoas kasının psoas majör kısmı lumbar pleksusun ilk iki dalından, pektineus kası aksesuar obturatör sinir tarafından innerve edilir.



Şekil 2.4 İliopsoas kasları ile kalçanın ön kapsülü arasındaki yakını ilişkiiyi gösteren femur boynu seviyesindeki kadaverik sağ kalçanın enine kesiti

(1) Femur başı. (2) Femur boynu. (3) Büyük trokanter. (4) İliopsoas kası. (5) Kalçanın ön kapsülü. (6) Rektal femoris kası. (7) Sartorius kası. (8) Tensör fasya lata kası. (9) Gluteus maksimus kası. (10) Gluteus medius kası. (http://www.springerimages.com/Images/MedicineAndPublicHealth/1-10.1007_978-1-4419-7925-4_7-20)

Kalça fleksiyonuna katkıda bulunan kaslardan iliopsoas kalça eklemindeki uyluğun en güç fleksörüdür. Psoas major ve iliacus, karın ve pelvis içinde iki kas olarak ortaya çıkar. Psoas major, 12. Torakal spinöz preses- 5. lomber vertebra arasından kaynaklanmaktadır. İliakus kası, ön iliak krestinden ve iliak fossa'nın üst üçte ikisinden kaynaklanır. Psoas ve iliacus kasları inguinal ligament düzeyinde ortak bir tendon oluşturmak için birleşerek bu yapıya geçer. Sartorius kası, spina iliaca anterior superiordan başlar ve pes anserinusta medial tibia'nın proksimal yönüne sonlanmak için uyluk boyunca aşağı doğru eğimli olarak uzanır. Kuadriseps kasının rektus femoris kısmı, anterior inferior iliak spine'dan kaynaklanan düz bir tendon ve

asetabulum üst kenarının üzerindeki oluktan kaynaklanan yansıtılmış bir tendon ile ikili bir kökene sahiptir. Bu kas, patella üst polünde kuadrisepslerin geri kalan üç kasıyla ve daha sonra da paylaşılan patellar tendon (ligament) yoluyla tibial tuberosite indirekt olarak ortak bir tendinöz insersiyö gösterir. Pektinus, pubisin pektineal çizgisinden kaynaklanır ve küçük trokanterden linea asperaya uzanan femurun pektineal çizgisine distal olarak insersiyö yapar. Pektinus iliopsoas kaslarına sadece medial olarak uzanır ve iki kas femoral üçgen içindeki femoral damarları sınırlar. Iliopsoas ile birlikte, pektinus kalça ekleminde birincil hareket olarak uyluğun fleksiyonuna katılır.

2.2.2.2 Uyluğun medial kompartman kasları:

Topluca, uyluğun medial kompartman kasları, kalça ekleminin addüktörleri olarak, kalçadaki uyluğun fleksörleri ve iç rotatörleri olarak aksesuar hareketleriyle tanımlanır. Bu kas grubu fonksiyonel olarak, adduktor brevis, adduktor longus, adduktor magnus ve grasilis kaslarından oluşur. Bu kaslar, innervasyonlarını, obturator sinirin ön veya arka bölümleri aracılığıyla alır. Adductor grubunun orijini, pubik kemiktedir. Medial kompartman kasları femur shaftı üzerinde distal bağlantılara sahiptir. Medial tibia'daki pes anserinus'a insersiyö yapan gracilis ve femurun adduktor tüberkülüne ek bir distal bağlanma olan adduktor magnus istisnaları vardır. Adduktor magnusun iskiyal tüberosit kaynaklı kısmı, siyatik sinirin tibial dalı yoluyla innervasyonunu aldığı ve uyluğun bir miktar ekstansiyonuna hamstring grubu ile katıldığı için bu kasın “hamstring kısmı” olarak kabul edilir.

2.2.2.2 Uyluğun posterior kompartman kasları:

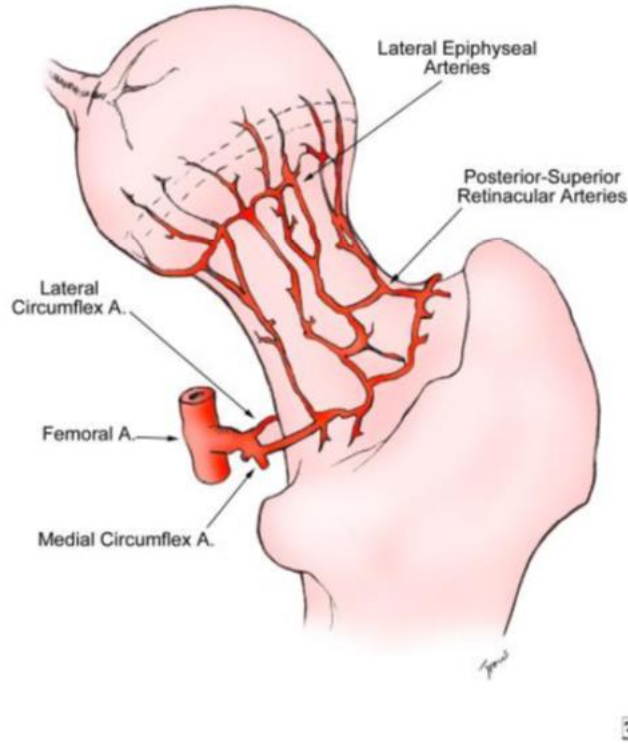
Posterior uyluğun hamstring kasları, semimembranosus, semitendinosus ve biceps femoristir. Siyatik sinirin tibial dalı ve birinci ve ikinci sakral spinal sinirler tarafından inerve edilir. Hamstringler iskiyal tüberosite ortak bir proksimal bağlantı bölgesini paylaşır. Bu kaslar kalçadaki uyluğun ekstansiyonuna yardım eder, ancak çok eklemlili kaslar oldukları için kalçadaki hareketleri diz pozisyonundan etkilenir.

2.2.3 Kalça ekleminin Kan Dolaşımı ve Sinirsel İnnervasyonu

Kalça eklemine yapılan inervasyonların bu eklemi geçen ve kalça eklemi kas sistemini besleyen sinirler tarafından sağlandığı kabul edilir. Özellikle obturator sinir, kalça eklemine innervasyon sağlayan sinir olarak en tutarlı şekilde tanımlanır ve kalça

eklemi ağrısının kontrolü için sinir bloklarının hedefidir.³⁴ Kalça eklemine ön ve ön-yan bölgesi femoral sinirden ek bir innervasyon alır.³⁵ Eklem kapsülünün arka elemanları, superior gluteal sinirden innervasyon alır ve siyatik sinirden doğrudan dallar alır.³⁵ Nosiseptif ve propriyoseptif lifler, asetabular labrumda tanımlandı, labrumun asetabulum üzerindeki bağlanma bölgesi yakınında yüksek konsantrasyonda nosiseptif ve propriyoseptif lifler bulunmuştur.³⁶ Ligamentum teres ayrıca, bu yapı içerisinde bulunan en yüksek konsantrasyondaki nosiseptif ve propriyoseptif innervasyonları alır.³⁶

Kadavra diseksiyonu çalışmalarının sonuçlarına dayanarak, genel olarak kalça eklemine kan tedarikinin birincil kaynağının medial femoral sirkumfleks arter (MFSA) olduğu kabul edilir. (Şekil 2.5)



Şekil 2.5 Femur başı ve boynunun damarsal beslenmesi

Tipik olarak ön uyluğun femur üçgeninde derin femoral arterin bir dalı olarak ortaya çıkar. (Şekil 2.6) MFSA'nın ana gövdesinin trokanter minöre doğru ilerlemesiyle, inen bir dal ve derin bir dal olarak bölündüğü, derin dal; ana gövdenin ve femoral başı besleyen ana damarın devamı olarak tanımlandığı görülmüştür.³⁷ İnen dallanma, özellikle arka uyluktaki kasları beslemek için ilerler. Derin dalın, obtüratör externusun arka tarafında ve kuadratus femorisin anteriorunda seyrettiği ve ardından kalça kapsülüne girmeden önce iki gemellus kasının ve obturator internusun tendonlarını geçtiği gözlenmiştir.³⁸ MFSA'nın derin dalının kalça kas yapısı ve femur boynu ile ilişkisi, özellikle kalça kırığı ile birlikte arkaya çıkıklarda önemlidir, bu damarın femoral başın avasküler nekrozu ile sonuçlanmasına neden olabilir. Femoral arterin derin dalı ile ek bir vasküler destek kaynağı olabilecek inferior gluteal arter arasında bir anastomoz olduğu öne sürülmüştür. Bu damarın seyri, piriformis tendonun inferior sınırı boyunca olması nedeniyle, inferior gluteal arterin piriformis dalı olarak tanımlanmıştır.³⁸ Asetabular labrum, obturator arterin yanı sıra, superior ve inferior gluteal arterlerin dalları ile vaskülarize olur.³⁴ Labruma kan temini kapsüler tarafındaki küçük damarlardan kaynaklanır ve bu damarlar labrumun kendi cismine derinlemesine nüfuz etmez. Bu labrumun çoğunu avasküler olarak bırakır ve labral yaralanmalarda ile iyileşmede sınırlılığa neden olur.



Şekil 2.6 Manyetik Rezonans Anjiyografi

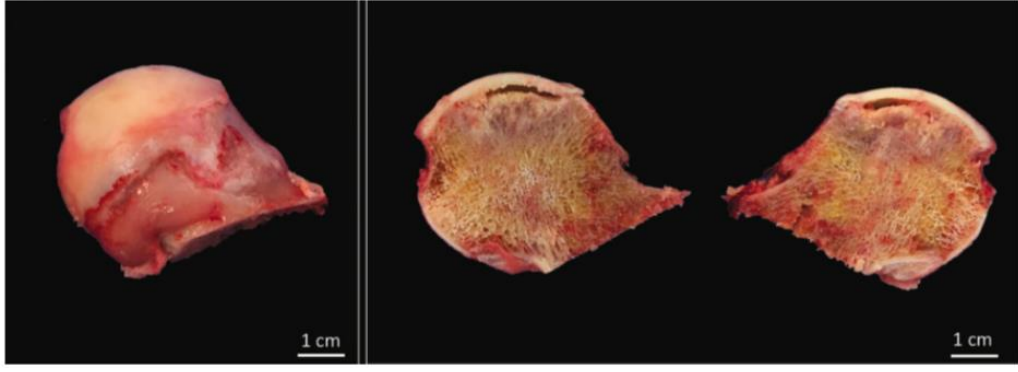
Medial sirkümfleks femoral arter ve derin dalı işaretlenerek gösterilmiştir.
(http://www.springerimages.com/Images/MedicineAndPublicHealth/1-10.1007_978-1-84800-088-9_9-3)

Kalça eklemının düzgün çalışması, hareket için gereklidir. Bu bölümde belirtildiği gibi kalça eklemının anatomik bileşenleri, ilişkili kapsüller, ligamentöz ve kas yapıları yoluyla stabilite ve mobilitayı dengeleyerek işlevine katkıda bulunur. Yeterli kan temini ve innervasyon da bu eklemın düzgün çalışmasını sağlar. Kalça eklemi patolojisinin tedavisinde bu yapılar ve aralarındaki anatomik ilişkiler hakkında bilgi sahibi olmak esastır.

2.3. FEMUR BAŞI OSTEONEKROZU (AVASKÜLER NEKROZ)

2.3.1 Femur Başı Osteonekrozu Genel Bilgiler

Aynı zamanda avasküler nekroz veya aseptik nekroz olarak da tanımlanan osteonekroz, travmatik veya travmatik olmayan bir kaynaktan kemiğe kan akışının bozulmasını izleyen kemik hücresi ölümü olarak tanımlanır.¹ Osteonekroz sıklıkla kalça ekleminde (femur başı) olur, fakat aynı zamanda diğer anatomik bölgelerde de (örneğin omuz, diz ve ayak bileği) ortaya çıkar.³⁹ Femur başı osteonekrozu (FBON) sıklıkla genç hastalarda görülen ilerleyici bir hastalıktır. Çoğunlukla aktif ve üretken çağıdaki bireylerde ortaya çıkan bu hastalık kişinin yaşamını olumsuz etkilemenin yanında, topluma da ağır bir yük getirmektedir. Femur başında osteositlerin ölümü ile başlayan ve ilerleyici nekroz sonrası subkondral kırık sonrası femur başında çökme (Şekil 2.7) ve kalça ekleminde dejeneratif artrit doğru ilerleyen bir süreçtir. FBON, kalça eklemının ilerici bir şekilde tahrip olmasına yol açar, erken osteoartrit ve total kalça artroplastisi (TKA) gereksinimine yol açar. Kanada, İsveç ve Avustralya kayıtları, bu tanının tüm primer TKA yaklaşık %2,8 ile %6 'sını oluşturduğunu göstermiştir. Şu anda, geç aşama FBON; Kuzey Amerika'da her yıl gerçekleştirilen tüm TKA prosedürlerinin %10' unu oluşturuyor.⁴⁰ Her ne kadar TKA osteoartrit için güvenilir bir cerrahi tedavi olsa da, genç hastalarda kullanımı implant yetersizliği ve daha riskli revizyon cerrahisine ihtiyaç duyulması nedeniyle zayıf uzun dönem sonuçları ile ilişkilidir.⁴¹



Şekil 2.7 Femur başı kesitinde osteonekroz ve subkondral çökme

FBON erkeklerde kadınlara göre daha sık görülmektedir ve sıklıkla bilateral olarak ortaya çıkmaktadır. Osteonekrozun en sık nedeni, damarsal yapıların hasarlanması ile kan akımında bozulma oluşturan travmadır.⁴² Bir çok non-travmatik nedeni olmakla birlikte, bu nedenlerin %90'ını kortikosteroid kullanımı ve alkolizm oluşturmaktadır.⁴³ Patogeneizde birçok hipotez ortaya atılmıştır. Bunlar arasında direk hücrel toksisite, oksidatif stres, koagülopatik olaylar, hiperlipidemi, yağ embolisi, vasküler anomali ve bozukluklar, yükselmiş kemik iliği basıncı bulunmaktadır. Bazı olgularda ise sebep tespit edilemez ve idiyopatik FBON olarak adlandırılır. Hastalığın ilk semptomu genellikle aktivite ve egzersizle artan ağrıdır. İlerleyen zamanlarda istirahat ağrı ve eklem hareket açıklığında kayba neden olur. Osteonekroz gelişen hastalar genellikle genç, aktif hastalar olduğundan, bu hastalar için erken tanı ve kalça koruyucu tedaviler önemli hale gelmiştir. Tedavide ana hedef femur başının korunmasıdır. Ancak çoğu hasta hastalığın ilerlemiş evrelerinde hekime başvurur. Bu sürecin yönetiminde erken tanı mümkün olsa da tedavi henüz yüz güldürücü değildir. Hastalığın progresif seyri nedeniyle morbiditesi yüksektir. Bu nedenle etiyolojiyi anlamaya ve tedaviye yönelik araştırmalar son yıllarda hız kazanmaktadır.

2.3.2 Femur Başı Osteonekrozu Epidemiyolojisi

Osteonekroz (ON) epidemiyolojisinin araştırılırken; hastalığın ayrıca aseptik, avasküler veya iskemik nekroz veya kemik enfarktüsü olarak da bilinmesi nedeniyle birkaç farklı takma ad kullanarak yapılan bir araştırmayı gerektirir. 2004 yılında

Japonya’da yapılan ulusal bir epidemiyolojik araştırma, yıllık yaklaşık 11.400 hastanın FBON için tedavi edildiğini ve yılda 2200 hastanın bu hastalığa yeni tanı konduğunu gösterilmiştir. Erkek kadın oranı 5:4 idi ve kesin tanıdaki en yüksek yaş erkeklerde 40’lar, kadınlarda 30’lardı. FBON’ un %51’inde steroidlerle, %31’inde ağır alkol alımı, %3’ünde her ikisi ve %15’inde ikisi de olmadığına karar verildi. FBON, erkek hastaların %34’ünde ve kadınların %76’ında steroid kaynaklı olarak bulundu. Steroid tedavisi gerektiren altta yatan hastalıklar %31.2’de sistemik lupus eritematozus (SLE), % 6.3’te nefritik sendrom, % 4.9’da polimiyozit / dermatomiyozit, % 4.5’de astım, %4.4 trombositopenik purpura ve geri kalanında diğer bağ dokusu hastalıklarıdır.⁴⁴ Steroid dozu ve FBON arasındaki ilişkiyi belirlemek için Japon SLE hastalarında ve böbrek nakli alıcılarında olgu kontrol çalışmaları yapıldı. FBON oluşumu ile bir yıl içinde birikmiş steroid dozu, maksimum doz ve ortalama günlük doz arasındaki ilişkiyi değerlendiren bu çalışmalar, ortalama günlük steroid dozunun FBON oluşumu üzerinde en güçlü etkiye sahip olduğunu buldu.⁶ Günde 16.6 mg / gün prednizolon alan SLE hastalarında günde 12.3 mg’dan daha az hasta alan hastalara göre 3.4 kat daha yüksek FBON riski vardı. Benzer şekilde, 20.4 mg / gün prednizolondan daha fazla alan böbrek nakli alıcıları, 14.92 mg / günden daha az alan hastalara kıyasla 5.0 kat daha yüksek FBON riski taşıyordu.⁶ 22 çalışmalık bir meta-analize göre steroid ile ilişkili FBON da oral steroid alımındaki her 10 mg/günlük artış hastalığın gelişmesinde 4,6 kat artışa neden olmaktadır.⁴⁵ FBON için eşik toplam doz 2000 mg olarak bildirilmiş ancak kısa dönem steroid kullanımında hastalık oluşturabileceği bildirilmiştir.⁴⁶

Steroid uygulamasına bağlı multifokal osteonekroz yalnızca femur başlarında değil humerus başlarında, diz eklemlerinde ve ayak bileği eklemlerinde görülebilir. Multifokal osteonekrozu olan hastaların %91’inde steroid tedavisi öyküsü olduğu bildirilmiştir.⁴⁷ Steroid kaynaklı FBON’lu 250 hastanın Manyetik Rezonans tarama çalışması dizlerinde % 50’sinde ve humerus başlarının % 24’ünde osteonekroz bulmuştur.⁶

2.3.3 Femur Başı Osteonekrozunda Etiyoloji ve Patogenez

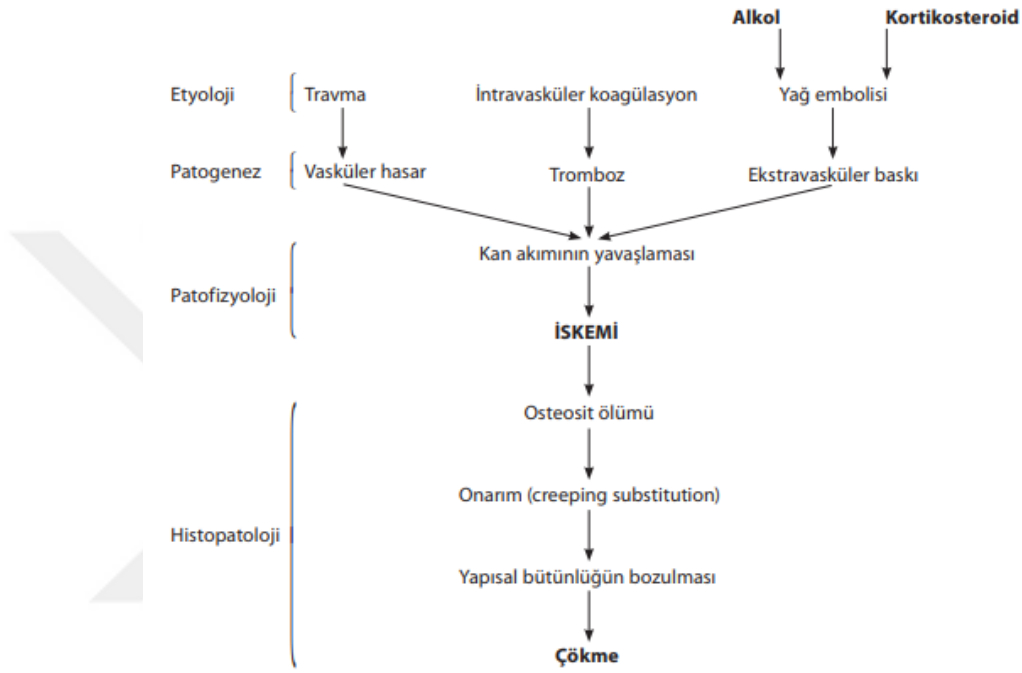
FBON herhangi bir etiyoloji ya da risk faktörü bulunmadan yani idiopatik (primer) olarak görülebilir. Ancak günümüzde etiyolojik etkenlerin aydınlatılması ile

sekonder olgular daha ağırlıklıdır. İdiopatik grubu dışarda tutacak olursak FBON'a neden olan sebepler tablo 2.1'te gösterilmiştir.

Tablo 2.1 Femur Başı Osteonekrozunun Sekonder Sebepleri

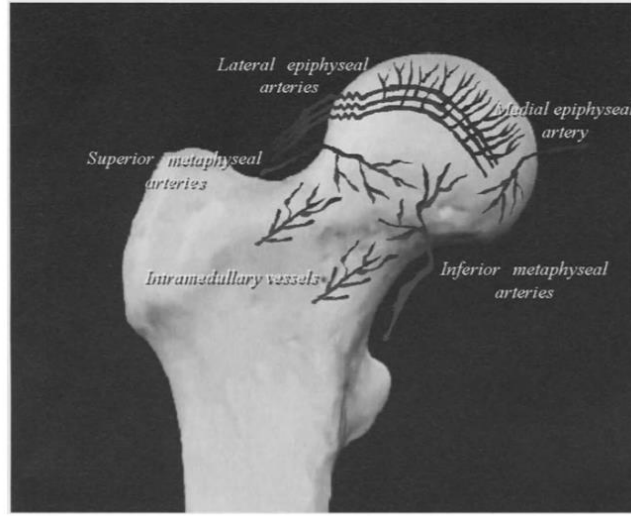
Travmatik Nedenler	Travmatik Olmayan Nedenler
1. Femur boyun kırığı 2. Kalça çıkığı 3. Kalçanın crush yaralanması 4. Vasküler yaralanma 5. Kalça cerrahisi 6. Kalça manipülasyonu 7. Geniş Yanıklar	1. Sistemik steroid kullanımı (En sık neden) 2. Aşırı alkol kullanımı 3. Kontraseptif ilaç kullanımı 4. Gebelik 5. Hiperlipidemi 6. Caisson (dekompresyon) hastalığı 7. Yüksek irtifada uzun süre kalmak 8. Organ transplantasyonu 9. Sigara kullanımı 10. Radyasyona maruz kalma 11. Koagülasyon sorunları ve hematolojik hastalıklar (Antitrombin III eksikliği, Protein C ve S eksikliği, Plasminojen aktivatör eksikliği, Hemofili, Polistemi, Orak hücreli anemi, Talasemi) 12. Metabolik hastalıklar (Hiperparatroidizm, Gut hastalığı, Cushing hastalığı, Gaucher hastalığı) 13. Gastrointestinal sistem hastalıkları (Pankreatit, Crohn , Ülseratif Kolit). 14. Kollajen vasküler hastalıklar (SLE, Romatoid artrit, vaskülitler)

Tablo 2.1’ de ki sebepler FBON patogenezinde farklı süreçler ile osteonekroza yol açarlar. Travma sonrasında mekanik vasküler yaralanma, kemik iliği dolgunluğu, venöz boşalım tıkanıklığı, tromboz ve embolizm, damar duvarı hasarı gibi süreçler daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. (Şekil 2.8)



Şekil 2.8 Osteonekrozun muhtemel patogenezi

Epifiz, femur başının büyüme plakasına yakın kısmıdır. Metafizinin geniş bir kısmı da femur başını oluşturur. Epifizin ve metafizin femur başı yapısına farklı anatomik katkısı, vasküler destekde bir benzerliğe sahiptir. Femur başı dolaşımına katılan damarlar lateral epifizeal arterler, superior metafizeal arterler, medial epifizeal arter, inferior metafizeal arterler ve intramedüller arterlerdir. Lateral epifizeal arterde kan akışının bozulması, avasküler nekrozdaki ana özelliği temsil eder. (Şekil 2.9)



Şekil 2.9 Epifizyal arterlerin orijini ve yolunun şematik gösterimi ⁴⁸

2.3.4 Kortikosteroid kullanımının Femur Başı Osteonekrozundaki Patogenezi

Non-travmatik FBON'un en sık nedeni kortikosteroid kullanımıdır.⁴³ 1950'de romatoid artrit tedavisi için kortizonun kullanılmasından bir yıldan az bir süre sonra araştırmacılar, Cushing sendromunda nadir görülen zararlı etkilerin farkında oldular.⁴⁹ Bu etkiler uykusuzluk, gastrointestinal kanama, kortizon sonrası yoksunluk sendromu ve kalça kırığıydı.^{50,51} Sadece birkaç yıl sonra, osteoporoz ve kırıklar, kortizon, prednizolon ve prednizon ile uzun süreli tedavinin iskelet komplikasyonları olarak açıkça kabul edildi. Yüksek doz steroid terapisinden sonra femur ve humerus başlarının çökmesi, bazen savunması zor olan bu tedavi için kısa bir süre sonra açıklanmıştır. Deksa metazon ve diğer glukokortikoidler, idiyopatik trombositopenik purpura, nefrotik sendrom ve sistemik lupus eritematozus gibi enflamatuvar ve otoimmün hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.⁵² Ortopedi ve Travmatoloji pratiğinde sinir yaralanmalarından sonra da kortikosteriod tedavisi verilir. Glukokortikoid ile indüklenen osteonekrozu olan ilk büyük hasta serisi 1971'de bildirilmiştir.⁵³ Femoral osteonekroz, topikal glukokortikoid merhem ile bile not edilmiştir.^{54,55} Günümüzde osteonekroz, uzun süreli tedavi alan hastaların % 9-40' ında gelişir ve glukokortikoid kaynaklı osteoporoz olmadan ortaya çıkabilir.⁵⁶

Kortikosteroidler sadece travmatik olmayan osteonekrozun en yaygın nedeni değil, aynı zamanda en kapsamlı olarak incelenmiş olanıdır. Osteonekroz gelişimi için önerilen mekanizmaların çoğu kortikosteroidlerin immünolojik ve hücrel etkilerini içerir ve bunlardan bazıları diğer etiyolojilerden osteonekroz için ortak olabilir. Gerçekten, glukokortikoidlerin immün sistem üzerindeki etkileri çok sayıda ve son derece karmaşıktır. Glukokortikoidler hem inhibitör hem de uyarıcı yolları içeren birçok seviyede gen transkripsiyonunu etkileme yeteneğine sahiptir. Bu yolların ne ölçüde etkilendiği, düzenleyici faktörlerin çoğu her iki sistem için ortak olduğundan hem immün sistem hem de kemik homeostazı üzerinde derin bir etkiye sahiptir.

Önceki klinik çalışmalar, steroid kaynaklı femur başı osteonekrozunun ortaya çıkmasının, aşırı steroid kullanımının en ciddi komplikasyonlarından biri olduğunu göstermiştir.⁵⁷ Glukokortikoid kaynaklı kırıkların önlenmesine olan ihtiyaç konusunda farkındalık artmaktadır ancak glukokortikoid uygulaması genellikle travma dışı osteonekrozun en yaygın nedeni olarak göz ardı edilmektedir. Primer histopatolojik lezyon osteosit apoptozu olduğundan osteonekroz ismi yanıltıcıdır. Apoptotik osteositler devam eder çünkü fagositoz için anatomik olarak bulunmazlar ve glukokortikoid fazlalığında azalmış kemik yeniden şekillenmesi replasmanlarını geciktirir. Kümülatif ve onarılamayan bir kusur olan glukokortikoide bağlı osteosit apoptozu; osteosit- laküner- kanaliküler sistemin mekanosensör fonksiyonunu bozar ve böylece femur başı çökmesine neden olan olayların kaçınılmaz olay dizisini başlatır. Steroid tedavisine başlama ile kalça ağrısının ilk semptomları arasındaki ortalama süre 33 aydır ancak bazı osteonekroz vakalarında sadece 3 ay sonra görülmüştür.⁵⁸

Steroid kaynaklı osteonekrozun kemikteki iskemi nedeniyle gelişmesi önerilmesine rağmen, ayrıntılı mekanizma net olarak anlaşılamamıştır. Bu nedenle, steroid uygulamasından dolayı steroid kaynaklı patogenezi anlamak ve bu durumu önlemek için önleyici yöntemler oluşturmak önemlidir. Kortikosteroide bağlı osteonekrozun mekanizması halen aydınlatılmamıştır. Üzerinde yoğunlaşılan hipotezler; yağ hücresi hipertrofisi, yağ embolisi, intravasküler koagülasyon, osteosit apoptozisidir. Yakın tarihli bir derleme makalesinde, Wang ve arkadaşları, steroid kaynaklı FBON patogenezi hakkında beş ana teori listelemişlerdir: lipid metabolizması

bozuklukları; azalmış osteogenez potansiyeli; yetersiz kan temini; hücre apoptozu; ve gen polimorfizmi. Yazarlar, steroidin indüklediği FBON'un steroid kullanımı ile ilgili multipl mekanizmaların kombine eyleminin sonucu olduğu sonucuna varmışlardır.⁵⁹ Tüm bu hipotezlerin ortak sonucu ise kemik ve kemik iliğinin kanlanması bozulması, kemik yapılarında iskemik nekroz oluşması, mekanik yetmezlik gelişmesi ve sonunda femur başının çökmesidir. Yüksek doz kortikosteroid verilen tavşanlarla yapılan bir çalışmada, yağ doku hipertrofisi ve yağ embolisi görülmüştür. Femur başlarında yağlı kemik iliği hücrelerinde artış saptanmış ve yağ embolilerinin femur başı kanlanmasını bozduğu gözlenmiştir.⁶⁰ Kortikosteroid verilen farelerle yapılan başka bir çalışmada ise benzer şekilde kemik iliğinde yağ hücre hipertrofisi gösterilmiştir.⁶¹ Kortikosteroid verilmesi sonrası oluşan yağ hücre hipertrofisinin, kısıtlı bir hacmi olan femur başında basınç artışı oluşturduğu düşünülmektedir. Bu durumun da kan perfüzyonunun azalmasına ve osteonekroz gelişmesine yol açtığı varsayılmaktadır. Diğer taraftan yağ embolilerinin subkondral damarlarda ve sinüslerde toplanması sonrası, kompleman yolun aktivasyonu ile immun kompleks depolanması, trombotik yolların aktivasyonu ile de intravasküler koagülasyon oluşması sonucu osteonekroz gelişebileceği düşünülmüştür.⁶² Kortikosteroid alan tavşanlarda kullanılan lipid düşürücü ajanların, büyük yağ hücrelerinin azalmasına, intrakortikal basıncın düşmesine ve kan akımının iyileşmesine yardımcı olduğu gösterilmiştir.^{63,64}

Son zamanlarda kortikosteroid kullanımına bağlı oluşan osteonekrozun patogeneğinde mekanizma olarak osteosit apoptozisi düşünülmektedir.^{65,66} Kortikosteroidle bağlı FBON nedeniyle TKA yapılan hastalarda femur başının patolojik incelemesinde apoptotik osteositler saptanmıştır. Bu bulgular travma ya da alkole bağlı FBON'da görülmemiştir.⁶⁷ Bu apoptotik hücrelerin birikerek osteosit-lakunar-kanalikular sistemin ve damarsal boşlukların bozulmasına ve femur başının çökmesine yol açtığı düşünülmektedir.

Son zamanlardaki çalışmalarda, *in vivo* oksidatif stresin steroidle bağlı osteonekrozun patogeneğinde rol oynadığı bildirilmektedir.^{68,69} Oksidatif stresin vasküler hasar ve hücre ölümü de dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların patogeneğinde yer aldığı giderek daha açık hale gelmiştir. Oksidatif stres koşulları altında, vasküler

ve doku hasarları bir sonuç olarak ortaya çıkmaktadır. Apoptozun yakın zamanda steroid kaynaklı ostenonekrozun altında yatan mekanizmalardan biri olduğu ve doku oksidasyonunun apoptozu indüklediği bilinmektedir. Ayrıca, oksidatif stresin osteoblastların çoğalmasını baskıladığı⁷⁰ ve bunlara sitotoksik⁷¹ olduğu düşünülmektedir. Bu nedenlerden dolayı, bu tez çalışmamızda steroid kaynaklı FBON gelişiminde rol oynadığı düşünülen oksidatif strese dikkat çekildi.

Son evre artiküler kollarıdan önce FBON' un erken tespiti, kronik steroid yapıda ilaç kullanımı olan hastalarda, hastalığın ilerlemesini geciktirme veya hatta geri çevirme potansiyeline sahip olan daha az morbid kemik koruyucu prosedürler; cerrahi müdahaleye izin verdiği için arzu edilir. Bu ihtiyaç, hematolojik maligniteler, otoimmün ve solunum yolu hastalıklarının tedavisinde steroid kullanımı için genişleyen endikasyonlar göz önüne alındığında daha belirgin hale gelmektedir.

2.3.5 Femur Başı Osteonekrozunda Klinik Bulgular ve Semptomlar

Hastalığın erken dönemleri genelde asemptomatiktir. Nekroz alanının fibröz vasküler doku ile tamirinin başladığı andan itibaren tek semptom ağrıdır ve ağrı genellikle kasıktadır ama hastalar kalça veya dizdeki ağrıdan şikayet edebilirler. Nadir olarak hastalar ağrılarını trokanter üzerinde veya gluteal bölgede hissedilebilir. Olguların %40'ında gece ağrısı görülür. Yürüme ve ayakta durmayla ağrı kötüleşebilir. Ağrı derin, aralıklı ve zonklayıcı tarzdadır. Steroid kullanımına bağlı FBON'larda ise ani ağrı krizleri görülebilir.

FBON'un muayene bulguları, kalçanın iç rotasyonunda olan ağrıyı içerir. Ciddi derecede kısıtlanmış kalça iç rotasyonu femur başı çöküşünü gösterebilir.⁷² Son evrede kısalık, kontraktür gibi artroz ve çökmeye ait bulgular kendini gösterir.

FBON'da bilateral tutulum oranının %50'nin üzerinde olduğu bilinmektedir. Erken dönemde eklem hareketleri korunmuştur. İlerleyen dönemlerde ise tamir işlemi, fibröz dokunun ilerlemesi ile sürer. Bu dokunun duvarları avaskülerdir ve subkondral kemikte oluşan segmenter çökmenin sebebidir. Bu dönemde hastanın ağrısının özellikle iç rotasyonda arttığı ve bu hareketin kısıtlandığı görülür. Hastalığın son dönemlerine kadar eklem kırıkdağı ve asetabulum korunur. Ancak eklem kırıkdağının bozulmasıyla bazı hastalarda, hareketlerle birlikte "klik" sesi şikayeti başlar. Bu

sempptomun eklem içi serbest fragman varlığına bağlı olduğu düşünülür. Kalçada dejeneratif artrit başlanmasıyla beraber ağrının şiddeti artar, eklem hareketleri kısıtlanır.

Femur başı osteonekrozunda tedavisinde başarıya ulaşmanın anahtarı erken tanıdır. Erken tanının önemi hastalıkta erken evrede alınacak önlemlerin ve uygulanacak tedavi yöntemlerinin kalça eklemine korumaya yönelik olmasıdır. Bu bakımdan Ortopedi ve Travmatoloji polikliniğine kasık ağrısı ile başvuran hastaların osteonekroz açısından değerlendirilmesi gerekmektedir.

2.3.6 Femur Başı Osteonekrozunda Tanı

Kalça eklemine korumaya yönelik tedavi seçeneklerine olanak sağlamak açısından FBON'da hastalığın erken evrelerinde tanı konulması oldukça önemlidir. Erken tanı koymak için iyi bir anamnez ve fizik muayeneye ilave olarak görüntüleme yöntemlerinin etkin kullanılmasına ihtiyaç vardır. Başarılı tedavi tanı anındaki evreleme ile doğrudan ilişkilidir. Evrelemede kullanılabilecek yöntemler; anteroposterior ve lateral direkt grafiler, manyetik rezonans görüntüleme (MRG), bilgisayarlı tomografi (BT), Teknesyum-99 kemik sintigrafisi ve pozitron emisyon tomografisidir.

Tanıda en çok kullanılan yöntemler direkt grafiler ve manyetik rezonans görüntülemedir (MRG). Hastalık ilerledikçe radyografik olarak femur başında yaygın osteopeni ve sklerotik bir sınırla çevrili radyolüsent alan, son evrelerde ise femur başında kollaps ve kalça eklemine dejeneratif değişiklikler izlenebilir. Radyografik muayenede subkondral '*crescent sign*' osteonekroz için patognomiktir (Şekil 2.10) ancak bu işaret erken değildir ve MRG femur başı şeklindeki herhangi bir değişiklikten veya subkonral kırık (*crescent*) görünümünden önce geniş osteonekrozu gösterebilir. Özellikle diyafizometafizyel yerleşimli osteonekrozlarda görülen erken radyografik bulgular yeterince özgül değildir. Net olarak seçilemeyen parçalı radyolüseni şeklinde izlenen bu bulgular, kemik destrüksiyonunu, osteomyeliti ve hatta agresif tümörleri bile taklit edebilir.



Şekil 2.10 Evre III Femur Başı Osteonekrozunda ‘crescent sign’

Hastanın semptomatik olması ancak direkt grafilerinde patolojik bulgu saptanmaması durumunda MRG inceleme yapılır. Eklem efüzyonları, kemik iliği konversiyonu, ödem ve eklem kıkırdağını gösterebilen MRG, bu açılardan bakıldığında da sintigrafi, direkt grafiler ve BT’ den daha üstündür. MRG günümüzde en yaygın kullanılan tanı yöntemidir. FBON hastalarında MRG incelemede saptanan ilk patolojik bulgu T1 ağırlıklı görüntülerde, normalde yüksek sinyal yoğunluğundaki kemik iliğinde düşük sinyal yoğunluklu yaygın alanların görülmesidir. Ancak bu bulgu özgün değildir ve kemik iliğindeki ödeme bağlı olduğu düşünülmektedir. T1 ve T2 ağırlıklı görüntülerde iskemik kemik bölgesi düşük sinyalli bantlar veya hatlar içerir. T1 ağırlıklı görüntülerde kalın bant tarzında sağlıklı ve nekrotik kemik doku ayrımını gösteren lezyon görülür. Dıştaki düşük sinyal intensitesi sklerotik kemiği, içteki yüksek sinyal intensitesi ise vaskülarize granülasyon dokusunu temsil eder. T2 ağırlıklı görüntülerde bu lezyon çift çizgi (*çift hat işareti*) şeklindedir; avasküler nekroz için yüksek özgünlüktedir ve karakteristiktir, bu bulgu röntgende skleroz olarak, sintigrafide hot spot olarak görülür. Osteonekrozda femur başına ve boynuna

yayılan difüz olarak dağılmış, sinyal değişiklikleri izlenebilir. Bu difüz tutulum şekli ağrı ve kemikte çökme gibi ilerleme bulguları ile ilişkilidir. Femur başında ve boynunda izlenen ödem, kalçanın geçici osteoporozu ile karıştırılabilir.

Femur boyun kırığı gibi bir travma sonrası MRG’ de FBON lezyonlarının oluşumu travma sonrası 4.haftada görülmüştür. Bununla birlikte, steroid kullanımının başlamasından sonra MRG’ de FBON lezyonlarının oluşumunun zamanlaması çeşitli araştırmalarda bakılmıştır ve altta yatan hastalığa göre lezyonların ortaya çıkış süreleri değişkendir. Steroid kullanımından sonra MRG’ de FBON lezyonlarının görülmesi 2-12 haftalar arasında değişirken, klinik semptomların oluşması 6 ay- 2 yıl arasında görülür.

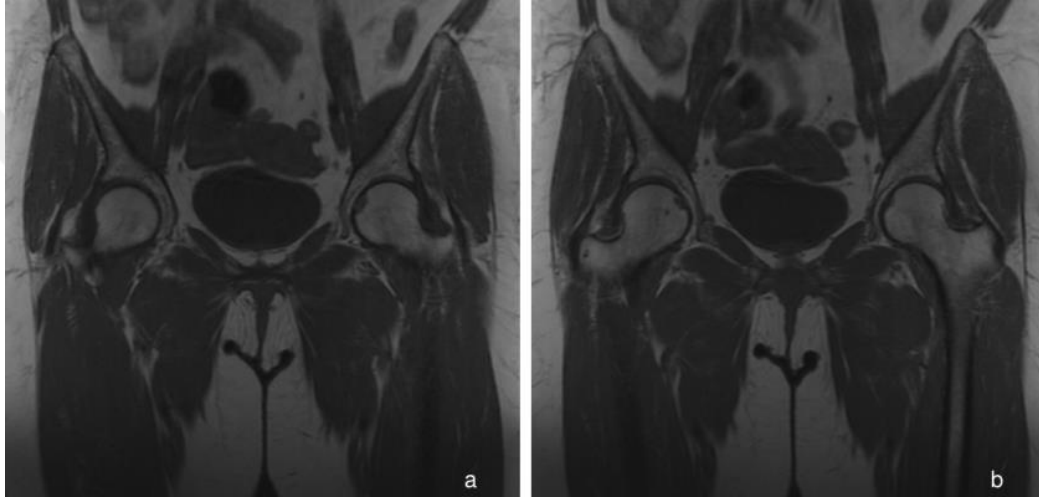
Bilgisayarlı tomografi hastalığın erken tanısı için kullanılmaz. Avasküler nekrozun seyrinde görülen kemikte çökmeyi, eklem içi serbest cisimleri ve dejeneratif hastalığı tanımak için yardımcı olur ve tutulumun yerleşimini gösterir.

Avasküler nekroz tanısında Teknesyum 99 metilen difosfonat kemik sintigrafisi kullanılabilir. Kemik taraması, bazen hastanın MRG kontrendikasyonları olduğunda veya diğer birçok eklem durumunu değerlendirirken faydalı olabilir. Enfarkt etrafındaki kemiğin reaktivitesi, geç dönem görüntülerde artmış izotop tutulumu şeklinde görülür. Ölü ve reaktif kemik doku bileşkesindeki artmış kemik döngüsünde, radyonükleotid birikimi ortaya çıkar. Nekrotik bölgede azalmış, onu çevreleyen alanda ise artmış aktivite tutulumu ile karakterize olan “cold in hot” görünümü nadir ancak karakteristik bir görünümdür. Femur başının sintigrafik görünümü ile kalça ağrısı ve fonksiyonu arasında bir ilişki yoktur.

Hastaya genel anestezi verilerek yapılan bazı invaziv tanı yöntemleri de mevcuttur. İntertrokanterik bölgeden sokulan kanül yardımı ile kemik iliği basıncı ölçümü (>30 mmHg olması tanısaldır), aynı kanülden 5 cc izotonik verilerek yapılan stres testi (basıncın 10 mmHg’den fazla artış olması tanısaldır), aynı kanülden 10 cc radyopak madde verilerek yapılan intramedüller venografi ve nekrotik femur başından core-dekompresyon yöntemi ile biyopsi alınması bunlara örnektir.

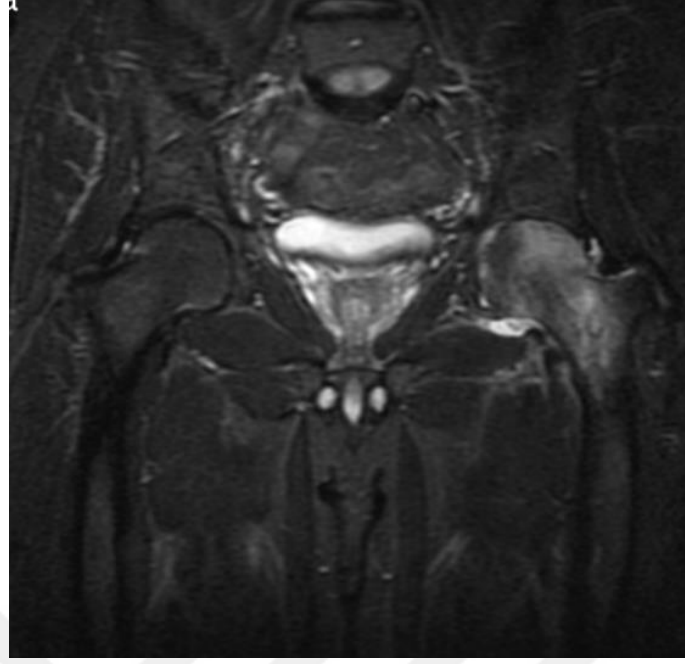
2.3.7 Femur Başı Osteonekrozunda Ayırıcı Tanı

Subkondral kistler, avasküler nekrozlar ile karışabilir. Ancak subkondral kistler daha keskin ve yuvarlak sınırlıdır. Subkondral yetmezlik kırıkları, travma sonucu ortaya çıkmayan, genellikle femur başı süperolateral kesiminde yerleşmiş lezyonlardır. Femur başı osteokondral lezyonları travmatik yaralanmalar sonucu ortaya çıkar. Metastazlar femur başında ender görülmekle birlikte avasküler nekrozlar ile karışabilir. Fovea santralis femur başının normal bir anatomik yapısıdır ve avasküler nekroz ile karıştırılmamalıdır. (Şekil 2.11)



Şekil 2.11 Sol femur başında (a) ve sağ femur başında (b) fovea kapitalis

İdiopatik geçici kalça osteoporozu sıklıkla görülen bir hastalıktır. (Şekil 2.12) Bu hastalığın diğer bir adı geçici kemik iliği ödemi sendromudur. Bu hastalığın etiyolojisi bilinmemektedir. Hastalık 2-6 hafta içinde semptomatik sağaltım ve kalçalar üzerine ağırlık vermekten kaçınmakla kendiliğinden geriler. Konvansiyonel grafilerde kalçada osteopeni izlenir. MRG’de T1 ağırlıklı görüntülerde hipointens T2 ağırlıklı görüntülerde hiperintens görünüm dikkat çekmiştir. Geçici osteoporoz ve osteonekroz arasındaki farklılaşma genellikle mümkündür, geçici osteoporozun kemik iliği ödemi femur başından intertrokanterik alana doğru uzanım gösterir ve proksimalde nekrotik segment olarak bir demarkasyon yoktur.



Şekil 2.12 MRG’de sol femur başında idiopatik geçici kalça osteoporozuna ait sinyal değişikliği

2.3.8 Femur Başı Osteonekrozunda Sınıflandırma

FBON sınıflaması zaman içinde birçok değişikliğe uğramıştır. Yapılan sınıflandırmalar prognoz ve tedavi için bir rehber oluşturmalıdır. Birçok sınıflama tanımlanmış olmasına rağmen bu bölümde sıklıkla kullanılan sınıflamalardan bahsedeceğiz.

Femur başı osteonekrozu için en sık kullanılan sınıflandırma şemaları Ficat ve Arlet sistemi (Tablo 2.2) ve Steinberg sistemidir (Tablo 2.3). Her ikisi de Steinberg sistemine MRI eklenerek düz radyografilerin değerlendirilmesine dayanmaktadır. Association Research Circulation Osseous (ARCO) sistemi nadiren kullanılır ve kavram olarak Steinberg sistemine benzer (Tablo 2.3).

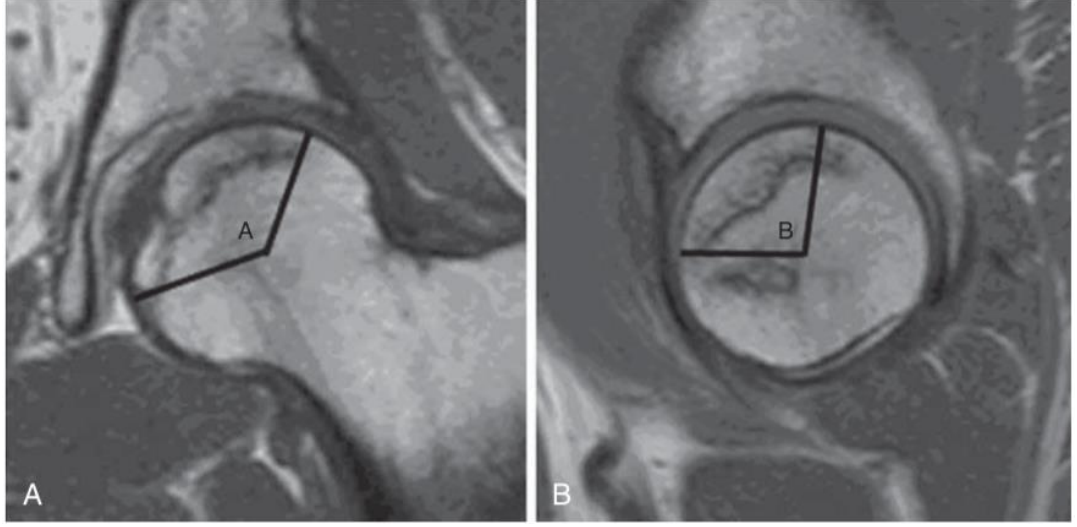
Yong-Chan ve arkadaşları MRG’de modifiye Kerboul yöntemini kullanarak; midsagittal ve midkoronal MRG kesitlerinden ölçülen başın eklem tutulumunun birleşik açısının, kollaps öncesi osteonekrozlu kalçalarda çökme öngörüsü olduğu göstermişlerdir.⁷³ (Şekil 2.13)

Tablo 2.2 Ficac ve Arlet Sınıflaması

Evre	Semptom	Radyografi	Kemik taraması	Patolojik bulgular	Biyopsi
0	Yok	Normal	Azalmış uptake		
1	Yok- Hafif	Normal	Femur başında <i>'cold spot'</i>	Femur başının yük binen kısmında infarkt	Bol ölü kemik iliği hücreleri, osteoblastlar, osteojenik hücreler
2	Hafif	Femur başında dansite değişikliği Skleroz veya kist, normal eklem hattı, normal femur başı konturu	Artmış uptake	İnfarkt olmuş alanın spontan onarımı	Nekrotik trabeküller arasında biriken yeni kemik
3	Hafif- Orta	Düzleşme (crescent sign) Sferite kaybı, kollaps	Artmış uptake	Subkondral kırık, kollaps, nekrotik segmentte kompaksiyon ve fragmentasyon	Kırık çizgisinin her iki tarafındaki ölü kemik trabekülleri ve kemik iliği hücreleri
4	Orta- Ciddi	Eklem aralığı daralması, Asetabuler değişiklikler	Artmış uptake	Osteoartritik değişiklikler	Asetabular kırıkta dejeneratif değişiklikler

Tablo 2.3 Femur başı osteonekrozu için ek sınıflamalar

Evre	Steinberg et al	ARCOS
0	Normal veya tanısal olmayan radyografik, kemik taraması ve MRG bulguları	Kemik biyopsisi osteonekroz ile uyumludur; diğer test sonuçları normal
I	Normal radyografik bulgular, anormal kemik taraması ve / veya MRG bulguları A: Hafif, <%15 baş tutulumu B: Orta, %15-30 tutulum C: Ciddi, >%30 tutulum	Kemik taraması, MRG veya her ikisinde de pozitif bulgular IA: <%15 baş tutulumu (MRG) IB: %15-30 tutulu IC: >%30 tutulum
II	Femur başındaki lüsen ve sklerotik değişiklikler A: Hafif, <%15 baş tutulumu B: Orta, %15-30 tutulum C: Ciddi, >%30 tutulum	Radyografilerde femur başı benekli görünümü, osteoskleroz, kist oluşumu ve osteopeni; radyografide veya BT'de femur başının kollaps belirtisi yok; kemik taraması ve MRG ile ilgili pozitif bulgular; asetabulumda değişiklik yok A: Hafif, <%15 B: Orta, %15-30 C: Ciddi, >%30
III	Femur başında düzleşme olmadan subkondral kollaps (<i>crescent sign</i>) A: Hafif, <%15 baş tutulumu B: Orta, %15-30 tutulum C: Ciddi, >%30 tutulum	Anteroposterior ve lateral radyografilerde görünümlere göre sınıflandırılan ' <i>crescent sign</i> ' lezyonlarının varlığı A: <%15, crescent veya <2 mm depresyon B: %15-30 crescent sign veya 2-4 mm depresyon C: > %30 crescent sign veya >4 mm depresyon
IV	Femur başında düzleşme A: Hafif, <%15 baş tutulumu B: Orta, %15-30 tutulum C: Ciddi, >%30 tutulum	Eklem yüzeyi düzleşmesi; eklem boşluğu daralması; Asetabulumda osteoskleroz, kist oluşumu ve marjinal osteofit bulguları ile değişim
V	Eklem daralması ve /veya asetabuler değişiklikler A: Hafif, <%15 baş tutulumu B: Orta, %15-30 tutulum C: Ciddi, >%30 tutulum	
VI	İleri dejeneratif değişiklikler	



Şekil 2.13 MRG taramalarından kombine nekrotik açının hesaplanması

A. Midkoronal görüntüde nekrotik alan açısı. B, Midsagittal görüntüde nekrotik alan açısı. Birleşik nekrotik açı = $A + B$.⁷³

FBON için sınıflandırma sistemleri aşağıdaki kilit noktaları içerir:⁷⁴

- (1) Kalça histolojik muayenesi (biyopsi) artık tanı için gerekli değildir;
- (2) Manyetik rezonans görüntüleme en hassas ve spesifik tanı yöntemidir;
- (3) Semptomatoloji, bireysel hastalar için tedavi stratejilerinin planlanmasında önemli olmakla birlikte oldukça değişken olduğu için hastalık şiddetinin güvenilir bir göstergesi değildir bu nedenle bir sınıflandırma sisteminin parçası olmamalıdır;
- (4) Prognozun ana belirleyicisi femur başının kollaps öncesi veya kollaps sonrası aşamada olup olmadığıdır;
- (5) Lezyonun boyutu prognoz için önemlidir; bununla birlikte lezyonun büyüklüğünü değerlendirmek için en iyi yöntem henüz tam olarak aydınlatılamamış veya tanımlanmamıştır;
- (6) Asetabuler eklem kıkırdak tutulumu, sınıflandırma sistemlerinde hastalık şiddetinin önemli bir belirleyicisidir. Yine, ameliyat öncesi veya ameliyat sırasında

muayene ile bunu belirleme yöntemi tam olarak aydınlatılamamış veya daha önce kullanılmamıştır;

(7) Femur başı depresyonu, hastalığın ilerlemesinin önemli bir prognostik göstergesidir;

(8) İlişkili çökmüş femur başı miktarının ve ayrıca crescent uzunluğunun ölçülmesi tekrarlanamayabilir;

(9) Lezyonun yeri, büyük lezyonlarla uğraşırken boyut kadar önemli olmayabilir, çünkü lateral lezyonlar genellikle büyüktür. Medial lezyonlar oldukça nadir olmakla birlikte tipik olarak küçüktür ve en iyi prognozla ilişkilidir.

2.3.9 Femur Başı Osteonekrozu Tedavi Seçenekleri

FBON'un progresyonu iyi belirlenememiştir, bu nedenle spesifik bir tedavi yönteminin hastalığın doğal seyrini değiştirip değiştirmediğini değerlendirmek zordur. Subkondral çökmeden önce erken evredeki doğal osteonekroz öyküsü hala belirsizdir, ancak kanıtlar, özellikle semptomatik hastalarda ilerleme oranının yüksek olduğunu göstermektedir. Tıbbi tedavi ve cerrahi müdahalenin semptomatik rahatlama sağladığı gösterilmiştir ve çökmeden önce erken müdahalenin eklem koruyucu prosedürlerde başarılı sonuçlar için kritik olduğu gösterilmiştir

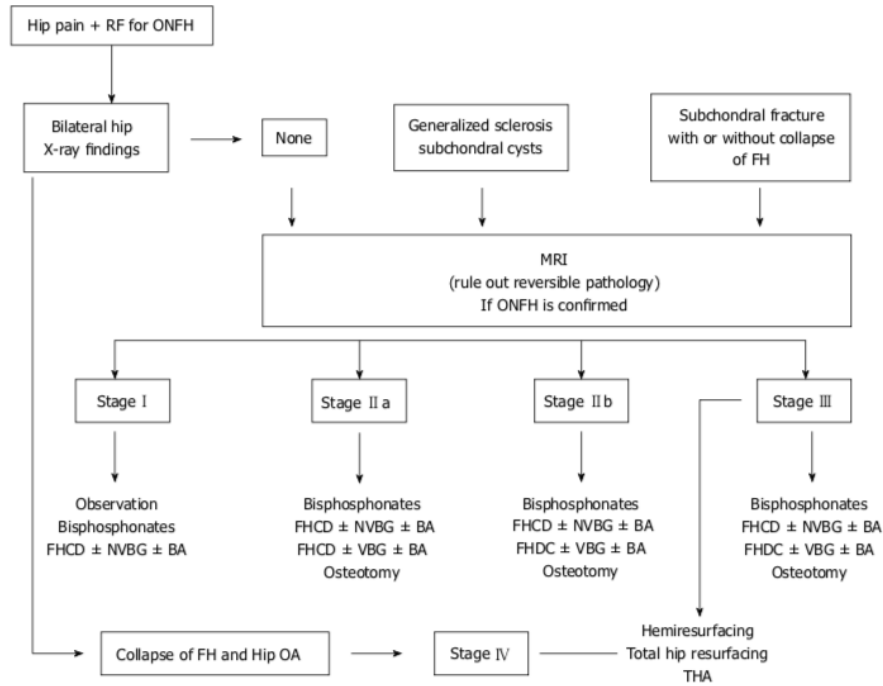
Lezyonun femur başı alanının %30'undan az olduğu asemptomatik osteonekrozun 5 yıldan fazla bir sürede çoğu hastada (%95) asemptomatik kaldığı gösterilmiştir. Lezyon boyutu arttıkça, ağrılı osteonekroz yüzdesi artmış, büyük lezyonlu (femur başı alanının>%50'si) kalçalarda %83'e kadar artmıştır.

Osteonekrozlu, kollaps olmamış femur başlarının 5 yıllık uzunlamasına bir çalışmada modifiye Kerboul yöntemini kullanılarak, Ha ve ark. 190 dereceden daha az kombine bir nekrotik açığa sahip hiçbir femur başı çökmezken, 240 dereceden daha fazla birleşik nekrotik açığa sahip tüm femur başları çöktüğünü bulmuşlardır.⁷³

Subkondral çökme meydana geldiğinde ve eklem boşluğu kaybolduğunda, ilerleyici osteoartrit genellikle geri döndüremez olarak kabul edilir. Subkondral

çökmeden önce hastalık sürecinin durdurulmasında veya subkondral çökmeden sonra femur başı yıkımı ve osteoartrit ilerlemesinin yavaşlamasında hiçbir tedavi yönteminin tamamen etkili olduğu kanıtlanmamıştır. Hastalığın ilerleme hızı ve seyri öngörülemez ve radyografik tablo klinik semptomlarla ilişkili olmayabilir; bazı hastalar femur başı çöküşünden sonra uzun bir süre tolere edilebilir fonksiyonunu korurlar.

FBON'da ideal tedavi hedefi kalça eklemine anatomik bütünlüğünü korumaktır. Hastalığın evresi, etiyolojide yer alan faktörler, semptomlar, hastanın yaşı, genel durumu, hastalığın bilateral olup olmaması, lezyonun boyutu, yerleşim yeri, femur başında çökme olup olmaması ve asetabular değişikliklerin olup olmaması tedavide belirleyici unsurlardır. (Şekil 2.14) Hastalığın erken evrelerinde kalça eklemine anatomik yapısının korunması mümkün olmaktadır ancak ileri evrelerde kalça artroplastisi uygulaması kaçınılmaz bir tedavi seçeneğidir.



Şekil 2.14 FBON olan hastaların yönetimi ve tedavisi için algoritma

RF: Risk faktörleri; ONFH: Femur başının osteonekrozu; FH: Femur başı; MRI: Manyetik rezonans görüntüleme; FHCD: Femur başı core dekompresyon; NVBG: Vaskülarize edilmemiş kemik grefti; BA: Biyolojik ajanlar; VBG: Vaskülarize kemik grefti; OA: Osteoartrit; THA: Total kalça artroplastisi.⁷⁵

Arka zemin hastalıklarının tedavisi için steroid kullanımına devam edilmesi gereken FBON hastaları için, nekrotik lezyonun genişlemesi veya diğer bölgelerde ilave kemik nekrozu nüksü ile ilgili endişeler olabilir. Bu endişeye yönelik çalışmalar, sürekli steroid kullanımı ile nekrotik lezyonun genişlemediğini göstermiştir.⁷⁶ Nekrotik lezyonun yeri ve boyutu sabitlendikten sonra, ilave kemik nekroz lezyonlarının ortaya çıkması oldukça nadirdir.⁷⁷ Steroidler devam etse bile tekrarlama oranı düşük olduğundan, FBON oluşumundan sonra steroid dozajını azaltmaya veya uygulamalarını kesmeye gerek yoktur, çünkü steroidler altta yatan hastalığı kontrol etmek için gerekli olmaya devam eder.

2.3.9.1 Femur başı osteonekrozunda konservatif tedavi :

Cerrahi dışı tedavi seçenekleri femur başı tutulumunun minimal olduğu durumlarda geçerlidir. Ağrının kontrolü gibi non-operatif yaklaşımlar, ancak tanıda şüphe olduğu ve takipte erken evrelerde, progresyonun olmadığı durumlarda söz konusudur. Birçok yazar evre 1 ve 2' deki kalçaların hastalığının takiplerinde ilerlenmenin olduğunu ve özellikle evre 3 lezyonları olan hastaların teşhis sonrası %68 oranında artroplastiye gereksinim duyduğunu ortaya koymuşlardır.⁷⁸ Özellikle evre 3 lezyonu olan hastalarda nonoperatif tedavi seçenekleri fayda sağlayamamaktadır.⁷⁹ Bu nedenle esas tedavi prensibi olan erken tanı ve kalça eklemine korunması progresyon riski olan hastalarda cerrahi tedavi seçeneklerini öncelikli düşündürmektedir. Nonoperatif yaklaşımlar; yük vermenin azaltılması, farmakolojik ajanlar, elektromanyetik ve ultrasonografi stimülasyonu, ESWT (Extracorporeal Shock Wave Therapy) ve hiperbarik oksijen tedavisidir.

Çökmenin gelişmediği, semptomsuz hastalarda farmakolojik ajanlar ile medikal tedavi tercih edilebilecek bir yöntemdir. Femur başı avasküler nekrozunda spontan iyileşme, tutulan alanın küçük, hastanın asemptomatik ve tutulumun tek taraflı olduğu olgular bir tarafa bırakılacak olursa, çok sık karşılaşılan bir durum değildir. Ancak bu tip olgularda, kalçanın yükten arındırılmasına ek olarak, vazodilatör (prostaglandin analogları- ilioprost), antikoagülan ilaçlar (varfarin, düşük molekül ağırlıklı heparin), lipid düşürücü ilaçlar (statin vb.), bifosfanatlar ve antioksidan ilaçların kullanımının umut verici sonuçları bildirilmiştir. Bu tarzda bir tedaviye karar

verildiğinde, kalçanın yükten arındırılmasının tek başına yetersiz olduğu unutulmamalı ve ilaçlar etyolojik faktöre uygun olacak şekilde seçilmelidir.

2.3.9.2 Femur başı osteonekrozunda cerrahi tedavi :

Basit olarak, FBON tedavisinde kullanılan cerrahi prosedürler femur başı koruyucu prosedürler ile artroplasti prosedürleri olarak ayrılabilir. Bunlar; core-dekompresyon, kemik grefti uygulaması, femur başı sementlemesi, vaskülerize fibula grefti uygulaması, proksimal femoral osteotomiler, femur başı yüzey artroplastisi ve total kalça artroplastisi ve kalça eklem artrodezi, rezeksiyon artroplastisidir (Girdlestone psödoartrozu).

Uygulamaların gelişmesi, günümüzde ameliyat sonuçlarını geliştirmek için insan mezenkimal kök hücrelerini ve kemik morfogenetik proteinlerini (BMP' ler) entegre etmiştir. Bu yeni yaklaşımlardan bazıları şunlardır: mezenkimal hücrelerle güçlendirilmiş kemik grefti; BMP ile güçlendirilmiş kemik grefti; ve gözenekli tantalum rod kullanımı.

Literatürde obez olmayan, genç, kortikosteroid kullanmayan, Ficat skalasına göre Evre 1 ve Evre 2 küçük merkezi lezyonlara sahip hastaların tedavisinde kor dekompresyon tedavisi desteklenmektedir. Ficat-Arlet Evre 3 hastalarda core dekompresyon tedavisinin 5 yıllık survisi %58, 10 yıllık survisi %35 civarındadır. Eklem kartilajının tutulumunun olmadığı, femur başında kollaps gelişmediği veya yeni kollaps geliştiği durumlarda kor dekompresyon ile birlikte iliak kanat, tibia, fibula veya trokanterden alınan kortikal ya da kansellöz otogreft uygulanması önerilmektedir.

Femur başı dekompresyonu, ölü kemiğin çıkarılması, subkondral kemiğin greft ile desteklenmesi ile beraber vaskülerize fibula grefti uygulaması ile başarılı sonuçlar bildirilmiştir. Uygulama tekniği zor olması ile birlikte kuvvet kaybı, duyu kusuru, ayak bileği problemleri gibi donör saha morbiditesi yaratması dezavantajlarıdır. Greftin yaşam süresi ise hastanın yaşı, lezyonun boyutu ve yeri ile ilişkilendirilmiştir fakat etiyoloji ve evre ile ilişkilendirilememiştir.

Femur başı osteonekrozunda uygulanan proksimal femoral osteotomilerde amaç ölü kemik segmentini yük taşıyan alandan uzaklaştırmaktır. Genç ve total kalça

artroplastisi seçeneğinin ertelenmesi söz konusu olan hastalarda, osteonekrozun erken evrelerinde ve küçük-orta boyutlu lezyonlarda osteotomilerin sonuçları daha iyi iken kollaps sonrası dönemde sonuçlar genelde kötüdür.

Femur başında 2 mm'den fazla çökmenin ve asetabuler tutulumun olduğu olgularda eklem replasmanı yani total kalça artroplastisi tercih edilir. (Şekil 2.15) Gerçek şu ki, subkondral kemik çöktüğü sürece, total kalça artroplastisi uygulanmasından başka önerilen başka ameliyat yoktur.

İleri evre osteonekroza sahip kalçalarda tedavi amacı ile kullanılmış ancak artık terk edilmiş diğer cerrahi teknikler; kalça artrodezi ve Girdlestone psödoartrozdur (rezeksiyon artroplastisi). FBON'da yüksek oranda bilateral kalça tutulumundan dolayı artrodez uygulamaları başarısızdır.

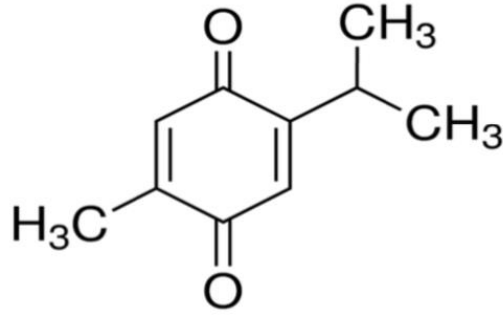


Şekil 2.15 FBON sonrası femur başı kollapsında total kalça protezi uygulaması

2.4. TİMOKİNÖN (THYMOQUİNÖNÖ)

Timokinon (TQ), pek çok tedavi edici etkileri ile umut verici tıbbi bitkilerden *Nigella Sativa* tohumlarının majör biyoaktif bileşigidir ve ilk olarak 1959 yılında El-Dakhakhany tarafından çörek otunun uçucu yağından timokinon izole edilmiştir.⁸⁰

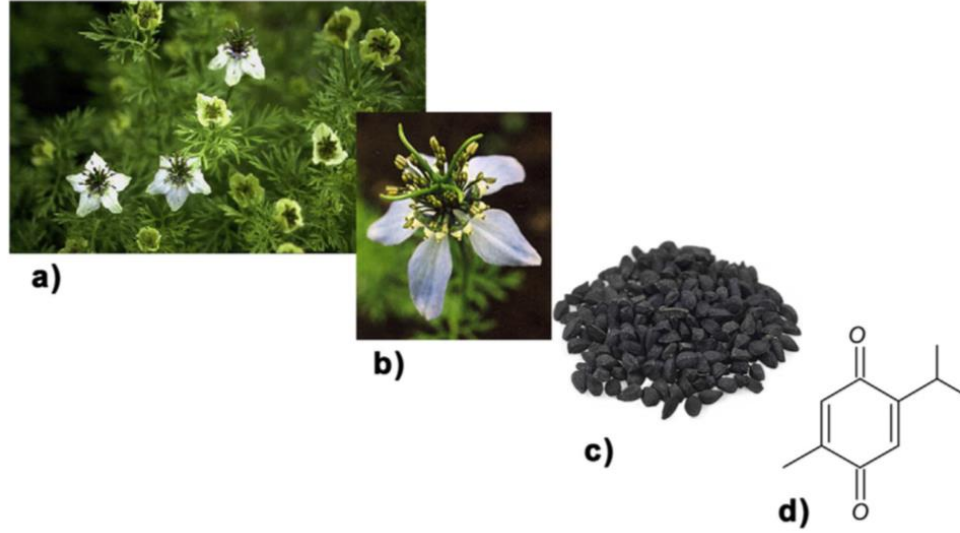
Timokinon, C₁₀H₁₂O₂ kimyasal formülünde, 164,201 g/m ağırlığında, koyu sarı renkli kristallere sahip uçucu bir monoterpen kinondur. (Şekil 2.16).



Şekil 2.16 Thymoquinone (2-Isopropyl-5-methyl-1,4-benzoquinone)⁸¹

Çeşitli hastalıkların iyileştirilmesi ve tedavisinde bitkisel ilaçların kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Bitkiler birçok fayda sağlayan kimyasal maddeler içermekte olup sağlık alanında yapılan araştırmalar ve ayrılan kaynaklar hem hastalıkların tedavisinde hem de koruyucu hekimlikte bitkisel ürünlerin kullanımını teşvik etmektedir. Bitki çeşitliliği bakımından oldukça zengin olan ülkemizde kara çörek otu veya siyah kimyon olarak da bilinen çörek otu, Ranunculacea (Düğün çiçeğigiller) familyasının *Nigella sativa* (NS) türü olup, Ortadoğu ve bazı Asya ülkelerinde çörek otu tohumu ve tohumundan elde edilen preparatlar, soğuk algınlığı, çeşitli romatizma ve iltihabi hastalıklar, astım, sarılık gibi pek çok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.⁸² Başta Doğu Akdeniz ülkeleri olmak üzere pek çok ülkede yaygın olarak tarımı yapılan ve besin tohumu olarak kullanılan çörek otunun, ülkemizdeki tarımı ve ticareti yapılan türü Black Cumin (*Nigella Sativa* L.) olup çoğunlukla Afyon, Isparta, Burdur ve Konya yörelerinde yetiştirilmektedir. Çörek otu fitokimyasal ve

farmakolojik olarak en fazla çalışılan bitkilerden biri olup biyolojik aktiviteleri ve kimyasal bileşenleri geniş bir şekilde araştırılmıştır. (Şekil 2.17)



Şekil 2.17 Nigella Sativa bitkisi

Nigella Sativa bitkisi(a), çiçek kısmı(b), tohumları(c), tohumların biyoaktif bileşeni olan Thymoquinone'un kimyasal yapısı, (d)¹²

Nigella sativa bitkisi %36-38 oranında sabit yağ, protein, alkaloid, saponin ve %0,4-2,5 oranında esansiyel yağ içerir. Nigella Sativa esansiyel yağında p-cymene, karvakrol, t-anetol, 4-terpineol ve seskiterpen longifolin bulunmakla birlikte ana bileşen %30-48 oranında bulunan timokinondur.⁸³ Nigella Sativa bitkisinin tohumunun biyolojik etkinliğini büyük oranda timokinon ile göstermektedir.⁸⁴ Timokinon (TQ), Nigella Sativanın farmakolojik olarak bilinen en aktif içeriğidir.⁸⁵⁻⁸⁷

TQ; çörek otunun uçucu yağında %18-24 oranında bulunan önemli bir biyoaktif bileşendir.⁸¹ Yapılmış olan çeşitli çalışmalar timokinonun; antioksidan^{83,88-90}, antiinflatuar^{86,91-94}, antihiperlipidemik⁹⁵⁻⁹⁹, kemik ve eklemler üzerine olumlu etkili¹⁰⁰⁻¹⁰³, analjezik^{94,104}, hipoglisemik^{105,106}, antidiyabetik^{107,108}, antitümöral¹⁰⁹, antiülserojenik¹¹⁰, antikanserojenik¹¹¹, gastroprotektif^{112,113}, hepatoprotektif¹¹⁴⁻¹¹⁶,

nöroprotektif⁸⁵, immun sistemi düzenleyici ve güçlendirici^{13,117-119}, antimikrobiyal¹²⁰, hipotansif¹²¹, antitusif etki¹²² gibi birçok etkilerinin olduğu gösterilmiştir.

Ensefalomiyelit, diyabet, astım ve kanser dahil çeşitli hastalık modellerinde timokinonun antioksidan ve antiinflamatuvar etkisi bildirilmiştir.¹²³ Yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu timokinonun bu iki etkisi üzerine odaklanmıştır.

Timokinonun farklı mekanizmalarla antioksidan etkileri olduğu bildirilmiştir. Süperoksit radikal anyonu ve hidroksil radikalleri de dahil olmak üzere çeşitli oksijen türleri üzerinde radikal temizleyici etkisi olduğu gösterilmiştir.¹²⁴ Yapılan deneysel çalışmada demir bağımlı mikrozomal lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir.⁹⁶ TQ, süperoksit radikal anyonu ve hidroksil radikallerini içeren birçok reaktif oksijen türlerinin süpürücüsü olarak etki gösterir.¹²⁵ Hücrel glutasyonu uyarak oksidatif stresi azaltması da diğer bir antioksidan özelliğidir.¹²⁶

Timokinon C-2, C-5 metil ve izopropil gruplarından, 2, 5-di-substitued sahip benzokinon gruplarından oluşur. Timokinon GSH, NADH ve NADPH ile reaksiyona girer. Fizyolojik şartlar altında gerçekleşen bu tür reaksiyonlar iki ürün oluşumu göstermektedir. Reaksiyonda GSH ile hızlı bir reaksiyonla dihidrotimokinon glutasyon, NADP ve NADPH ile yavaş bir reaksiyonla dihidrotimokinon (DHTQ) oluşur. 2,2/ azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic asid) (ABTS) ve 2,2-difenil-1-pikril hidrozil (DPPH) gibi organik radikallere karşı indirgenmiş antioksidan aktivitesinin ölçülmesi DTHQ benzer dihidrotimokinon glutasyon için potansiyel bir süpürücü aktivite saptandı. Timokinon ise daha düşük süpürücü faaliyetler gösterdi. Bu bileşiklerin antioksidan kapasite eşdeğeri standart bir antioksidan bileşik olarak kabul edilmesi dikkat çekicidir. Bu sonuçlar belkide GSH, NADH ve NADPH'ın timokinonun olası bir hücre içi enzimatik olmayan modüler hücrel antioksidan savunmalar için "*hücrel anahtarı*" temsil etmektedir.¹²⁷

Yine bir rat çalışmasında deneysel olarak testiküler iskemi-reperfüzyon çalışmasında, timokinonun apoptozis, oksidatif stres ve lipid peroksidasyonunu azaltarak etki ettiği bildirilmiştir.¹²⁸

Çeşitli çalışmalarda timokinonun kemik ve kırık dokular üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir. TQ osteoklastları inhibe ederek kemik matriks rezorpsiyonunu

azaltarak osteoprotektif etki gösterir.¹⁰³ Yapılan bir hayvan çalışmasında TQ'nun önemli yaşamsal ve reproduktif organlarda belirgin bir yan etkisi olmaksızın kemik iyileşimini arttırdığı gösterilmiştir.¹⁰⁰ Romatoid artrit ve osteoartrit gibi eklem hastalıklarının tedavisinde antioksidan, antikatabolik, antiinflamatuvar etkilerinden dolayı TQ güvenli ve etkili bir tedavi olarak kullanılabildiği gösterilmiştir.¹⁰² Yapılan benzer bir çalışmada ratların pençelerindeki inflamasyon bulguları ile radyolojik bulgular belirlenmiş olup TQ'nun ratlarda bir adjuvantın neden olduğu artriti baskıladığı klinik ve radyolojik olarak doğrulanmıştır.¹⁰¹

Farelerde TQ'nun ağrının erken ve geç safhalarında etkili olduğu ve analjezik etkileri ile ağrıyı baskıladığı bildirilmiştir.¹⁰⁴

Timokinon inflamasyon sitokinlerinin salınımını azaltır.¹²⁹ Oral alımı sonrası IL-6, IL-10, IL-1 β , PGE₂, IFN- γ ve TNF- α proinflamatuvar sitokin düzeylerini düşürdüğü ve antiinflamatuvar sitokin olan IL-10 düzeylerini artırdığı gösterilmiştir.¹³⁰ Ayrıca, siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimini bloke ederek, tromboksan B₂ ve lökotrien B₄ üretimini azaltarak inflamasyona etki etmektedir.¹³¹

TQ, kalsiyum iyonofor A23187 ile uyarılan rat peritoneal lökositlerindeki araşidonat metabolizmasının hem COX hemde LO yollarını inhibe eder. Bu yüzden COX ve LO'nun inhibisyonu, TQ'nun antiinflamatuvar etkilerini düzenleyen anahtar bir faktördür.⁹²

Yapılan bir çalışmada rat bazofil hücrelerinde, lipopolisakkaritin indüklediği, immün ve inflamatuvar yanıtların çok önemli bir aracısı olan tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) üretiminin belirgin olarak arttığı buna karşın TQ tedavisinin ise TNF- α mRNA ekspresyonunu ve protein üretimini önemli ölçüde inhibe ettiği ve NF- κ B'nin nükleer transaktivasyonunu modüle ederek proinflamatuvar yanıtları azalttığı belirtilmektedir.⁸⁶

İnflamasyonlu ve otoimmün hastalıklarının iyileştirilmesinde TQ'un makrofajlarda NO üretimini azaltarak yararlı olabileceğini ortaya koymuştur. TQ, NO sentezi için bir parametre olan ve zamana bağlı olarak lipopolisakkarit (LPS) tarafından uyarılan makrofajların supernatantlarında nitrit üretimini azaltmış, periton

makrofajlarındaki i-NOS protein düzeyini de konsantrasyona bağı olarak düşürmüştür.¹¹⁷

Nigella sativa tohumlarının immun sistem üzerine etkisi incelenmiş, hem yağın hem de TQ'nun T hücrelerine ve immün yanıtı aracılık eden öldürücü hücrelerinin artışı sağladığı ve önemli immünomodülatör etki yaptığı belirlenmiştir.¹³

Pankreas duktal adenokarsinoma hücrelerinde TQ' nun doz ve zamana bağı olarak COX-2, interlökin (IL)-1beta, TNF- α sentezini azalttığı ve NF- κ B'nin inhibisyonuna paralel olarak antiinflamatuvar aktiviteye sahip olduğu belirtilmektedir.¹³²

TQ çeşitli mekanizmalar ile antioksidan özellik göstermekte olup 5-hidroksieikozatetraenoik asit ve 5-lipoksijenaz üretimlerini inhibe ettiği bildirilmektedir.⁹¹ Badary ve arkadaşları doksorubisin ile indüklenen nefropati ve oksidatif stres üzerine TQ'nun yüksek antioksidan potansiyele sahip olduğunu ve DOX'un indüklediği nefropatiyi baskıladığını bildirmişlerdir.¹³³

TQ kullanımı çeşitli deneysel hayvan çalışmalarında güvenli dozlarda ve düşük yan etkili olduğu gösterilmiştir. TQ'nun akut oral toksisitesinin düşük seviyelerde olduğunu göstermiştir. Subkronik olarak verildiğinde ise hücre içi koruyucu aktiviteye sahip olacağı belirtilmiştir.¹³⁴ TQ 8 mg/kg olarak intraperitoneal (IP) verildiğinde toksik olarak bulunmuştur.⁹⁵ Araştırma sonucunda, TQ'nun deney hayvanlarına özellikle oral verildiğinde oldukça güvenli bir bileşik olduğu belirlenmiştir.¹³⁵

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. ÇALIŞMA PLANI

Bu tez çalışmasının hayvan deneyleri yerel etik kurul onayı; Sağlık Bilimleri Üniversitesi İstanbul Bağcılar Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Deneysel Araştırma ve Beceri Geliştirme Merkezi (BADABEM)'nden alındı. (Toplantı tarihi: 05.03.2019, Toplantı No: 2019/57, Proje No: 2019-03)

Bu tez çalışması; deneysel hayvan çalışması şeklinde tasarlanmıştır. Çalışmamız tüm süre boyunca ETS-123, Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlar için Omurgalı Hayvanların Korunması için Avrupa Konseyi Standartları'na (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes) uygun olarak BADABEM'de gerçekleştirildi. Çalışma planlanırken klinik öncesi hayvan çalışma ve araştırmaları ile ilgili standart prosedürler tasarlandı ve uygulandı.¹³⁶

Çalışmamız, ortalama ağırlığı 356 gram (330-375 gram); yaşları 12 haftalık olan toplam 24 adet Sprague-Dawley cinsi genç-erişkin erkek sıçan ile gerçekleştirildi. Tüm sıçanlar, günlük olarak, çalışma boyunca 22°C sıcaklıklı ortamda 12 saat aydınlıkta ve 12 saat karanlıkta kalacak şekilde takip edildiler. Çalışmamız boyunca, ilaç uygulama öncesi ve sonrası dönem ayırt edilmeksizin, limitsiz olacak şekilde standardize edilmiş kemirgen yemi ve musluk suyu (ad libitum) verildi. Çalışmamızda kullanılan deney hayvanları laboratuvar sorumlusu veteriner hekim Duygu Sultan Oran tarafından günlük olarak gözlemlendi.

Çalışmamızda kullanılan sıçanların hepsinin sağlıklı ve erkek cinsiyette olması, Sprague Dawley cinsi olması, yaşlarının 12 hafta olması, herhangi bir sistemik hastalığının olmaması ve daha önce herhangi bir çalışmada kullanılmamış olması çalışmaya dahil etme kriterlerimizdir.

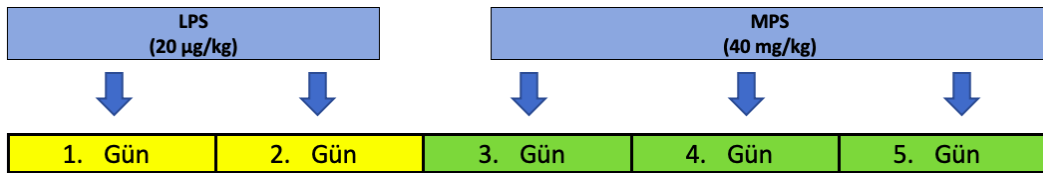
Çalışmadan hariç tutma kriterleri; veteriner hekimin uygun görmemesi, hayvanın prosedür boyunca %20 den fazla kilo kaybetmesi, düzenli yem ve su alamama, uyarılara belirgin derecede azalmış yanıt verme, enfeksiyon gelişmesi olarak belirlendi.¹³⁷

Çalışmamızda kullanılan hiçbir sıçan, çalışmaya uygun olmayacak herhangi bir kriter olmadığından, çalışma dışı bırakılmamıştır. FBON modeli öncesi ve sonrası dönemde, çalışmaya dahil edilen hiçbir hayvan ölümüne rastlanmamıştır veya FBON oluşturma prosedürü ile ilgili komplikasyon yaşanmamıştır.

3.1.1. Sıçanlarda Gruplama ve Femur Başı Osteonekroz Modeli oluşturulması

Tüm sıçanlar deney başlamadan önce altta yatan hastalık olasılığını dışlamak için hayvan bakım laboratuvarında 7 gün boyunca gözlemlendiler ve takip edildiler. İlki kontrol grubu (salin grubu), diğer üçü çalışma grubu olacak ve toplam dört grup için, her grupta 6 sıçan rastgele seçilecek şekilde; toplam 24 sıçan çalışmaya dahil edildi (Tablo 3.1). 24 hayvan rastgele olarak eşit sayıda 4 gruba ayrıldı. Her grup bir kafese alınarak, her kafeste 6 sıçan olacak şekilde her birinin boyutu 60x21x21 cm olan toplam 4 kafese yerleştirildi.

Çalışmamızda, Dong ve arkadaşları tarafından uygulanmış olan steroid ve lipopolisakkarit ile indüklenmiş femur başı osteonekroz modeli kullanılmıştır.¹³⁸ FBON modeli oluşturulan 3 ve 4. gruplardaki toplam 12 sıçana; çalışmanın 1 ve 2. günlerinde intraperitoneal yolla 20 µg/kg Lipopolisakkarit (LPS, Echerichia Coli O55:B5, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) iki doz olarak 24 saat ara ile verildi ve aynı sıçanlara 24 saat sonra 3-4-5. günlerde 24 saat ara ile üç doz intramüsküler yolla 40 mg/kg Metilprednizolon Sodyum Süksinat etken maddeli *Prednol* (Mustafa Nevzat İlaç Sanayi AŞ, Türkiye) ilacı uygulandı. (Şekil 3.1)



Şekil 3.1 FBON modeli oluşturma protokolü

LPS: Lipopolisakkarit, MPS: Metilprednizolon Sodyum Süksinat

Çalışmanın toplam süresi dört haftadır. Dördüncü haftanın sonunda tüm gruptaki sıçanlar genel anestezi altında intrakardiyak kan alma işlemi sonrası sakrifiye edilerek sağ femurları cerrahi olarak çıkartıldı.

Tablo 3.1 Deney hayvanlarının gruplara göre dağılımı

Deney grupları	Grup adları	Hayvan sayısı
1. Grup: Salin	Kontrol (C)	6
2. Grup: Timokinon	TQ	6
3. Grup: LPS + Steroid + Salin	LPS/MPS	6
4. Grup: LPS + Steroid + Timokinon	LPS/MPS + TQ	6

1. Grup: Bu grubumuz '*Kontrol (C) grubu*' olarak tanımlanmıştır. Çalışma boyunca bu gruptaki tüm sıçanlara ilk günden başlamak üzere her gün ve günde bir kez orogastrik lavaj yolu ile salin solüsyonu uygulandı. Tüm sıçanlara dördüncü haftanın sonunda genel anestezi altında kan alma ve sakrifikasyon işlemi uygulanmıştır.

2. Grup: Bu grubumuz '*TQ grubu*' olarak tanımlanmıştır. Çalışma boyunca bu gruptaki tüm sıçanlara ilk günden başlamak üzere her gün ve günde bir kez orogastrik gavaj yolu ile 10 mg/kg/gün *Thymoquinone* (Sigma-Aldrich Chemistry, St.Louis, MO, USA) verildi. Tüm sıçanlara dördüncü haftanın sonunda genel anestezi altında kan alma ve sakrifikasyon işlemi uygulanmıştır.

3. Grup: Bu grubumuz '*LPS/MPS grubu*' olarak tanımlanmıştır. Gruptaki tüm sıçanlara femur başı osteonekrozu oluşturmak amacıyla; literatürde belirtildiği üzere; 1. ve 2. günlerde (24 saat arayla) intraperitoneal yolla 20 µg/kg Lipopolisakkarit (LPS,

Echerichia Coli O55:B5, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) 2 doz olarak uygulanmış ardından da 3.- 4. ve 5. günlerde (24 saat arayla) birer doz olmak üzere intramüsküler yolla 40 mg/kg Metilprednizolon Sodyum Süksinat etken maddeli *Prednol* (Mustafa Nevzat İlaç Sanayi AŞ, Türkiye) ilacı uygulanmıştır. Ek olarak çalışma boyunca bu gruptaki tüm sıçanlara ilk günden başlamak üzere her gün ve günde bir kez orogastrik gavaj yolu ile salin verilmiştir. Tüm sıçanlara dördüncü haftanın sonunda genel anestezi altında kan alma ve sakrifikasyon işlemi uygulanmıştır.

4. Grup: Bu grubumuz '*LPS/MPS + TQ grubu*' olarak tanımlanmıştır. Gruptaki tüm sıçanlara femur başı osteonekrozu oluşturmak amacı ile literatürde belirtildiği üzere; 1. ve 2. günlerde (24 saat arayla) intraperitoneal yolla 20 µg/kg Lipopolisakkarit (LPS, Echerichia Coli O55:B5, Sigma, St.Louis, MO, USA) 2 doz olarak uygulanacak ardından da 3- 4. ve 5. günlerde (24 saat arayla) birer doz olmak üzere intramüsküler yolla 40 mg/kg Metilprednizolon Sodyum Süksinat etken maddeli *Prednol* (Mustafa Nevzat İlaç Sanayi AŞ, Türkiye) uygulanmıştır. Çalışma boyunca bu gruptaki tüm sıçanlara ilk günden başlamak üzere her gün ve günde bir kez 10 mg/kg/gün *Thymoquinone* (Sigma-Aldrich Chemistry, St.Louis, MO, USA) orogastrik gavaj yolu ile uygulandı. Tüm sıçanlara dördüncü haftanın sonunda genel anestezi altında kan alma ve sakrifikasyon işlemi uygulanmıştır.

Timokinon (*Thymoquinone*); Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) firmasından ithal edilmiştir ve Phosphate Buffer Saline (PBS) solüsyonunda çözmek üzere günlük olarak hazırlanmış ve orogastrik yol ile verilmiştir. (Şekil 3.2)



Şekil 3.2 Sıçana orogastrik lavaj yolu ile Timokinon uygulaması

Tüm denekler dördüncü hafta sonunda anestezi altında kan alma işleminin ardından sakrifiye edildi ve femur kemikleri çıkarıldı. Cerrahi teknik kısmında femur kemiği çıkarma işlemleri mevcuttur. Çalışma prosedüründe model oluşturma, kan alma ve ameliyat işlemleri, tüm hayvanlar aynı cerrah tarafından yapılacak şekilde planlandı ve uygulandı.

Histolojik, immünohistokimyasal ve radyolojik değerlendirmeler için çıkarılan tüm kemikler %10'luk formaldehit sıvısı içerisinde korunacak ve her kaptaki bir kemik olacak şekilde gazlı bez ile sarılarak bu kaplara yerleştirildi. (Şekil 3.3) Tüm gruplardaki tüm kemikler önce radyolojik değerlendirme için mikro bilgisayarlı tomografi incelemesine; sonra histolojik, immünohistokimyasal incelemeye gönderildi. İstatistiksel analizin anlamlılığının korunması açısından, radyolojik değerlendirme için n=6, histolojik değerlendirme için n=6 olarak belirlendi.



Şekil 3.3 Gazlı beze sarılan femur kemiği

%10'luk formaldehit sıvısı ile dolu kaba konulmuştur.

3.2. CERRAHİ TEKNİK

3.2.1. Anestezi

Tüm sıçanlara dördüncü haftanın sonunda BADABEM operasyon salonu-1 'de genel anestezi uygulandı. (Şekil 3.4) Her bir sıçanın ağırlığı, elektronik tartı ile alınarak kaydedildi ve genel anestezi için gerekli olan dozlar belirlendi. İntraperitoneal 80 mg/kg Ketamin HCl (*Ketalar®*, Pfizer, Türkiye) ve intraperitoneal 5 mg/kg Ksilazin HCl (*Rompun®*, Bayer, Türkiye) kullanılarak genel anestezi uygulandı. Tüm deneklerin anestezi ilaç uygulaması sonrası ile intrakardiyak kan alma işlemi yapıldı (Şekil 3.5). Bunlar daha sonra serumdan biyokimyasal olarak değerlendirme yapılmak üzere kullanıldı. Kan alma işleminden sonra tüm sıçanlar genel anestezi altında iken servikal dislokasyon yoluyla sakrifiye edildi.



Şekil 3.4 BADABEM Operasyon Salonu -1 görünümü



Şekil 3.5 Sıçan intrakardiyak kan alma işlemi görüntüsü

3.2.2 Cerrahi Teknik

Sakrifikasyon sonrası tüm sıçanlar aynı cerrah tarafından, aynı cerrahi yaklaşım ile femur kemiği çıkarma işlemi yapıldı. Çalışmamızda kullanılan sıçanlar ameliyat masasına alınarak, sakrifikasyon sonrasında, sağ kalça ve uyluk bölgeleri açığa çıkarıldı ve tıraş edildi (**Şekil 3.6**). Sağ uyluk anteriondan femur diyafizi palpe edilerek, yaklaşık beş santimetre longitudinal insizyonla girildi. Rektus femoris ve vastus lateralis arasındaki klivaj belirlendi ve bu klivajdan girildi. Femur diyafizi, S ekartörler kullanılarak periosta zarar verilmeyecek şekilde açığa çıkarıldı, femur cismi, baş ve boynu üzerindeki yumuşak dokular (kas, fasya, kapsül vb.) nazikçe ve femur başına zarar verilmeden, kalça ve diz eklemleri de korunacak şekilde temizlendi ve çıkarıldı (**Şekil 3.7 ve 3.8**).



Şekil 3.6 Sıçan sakrifikasyon sonrası cerrahi işlem öncesi görünüm



Şekil 3.7 Kontrol grubundan bir sıçanda FBON gelişmemiş femurun çıkarma işlemi sonrası görünümü

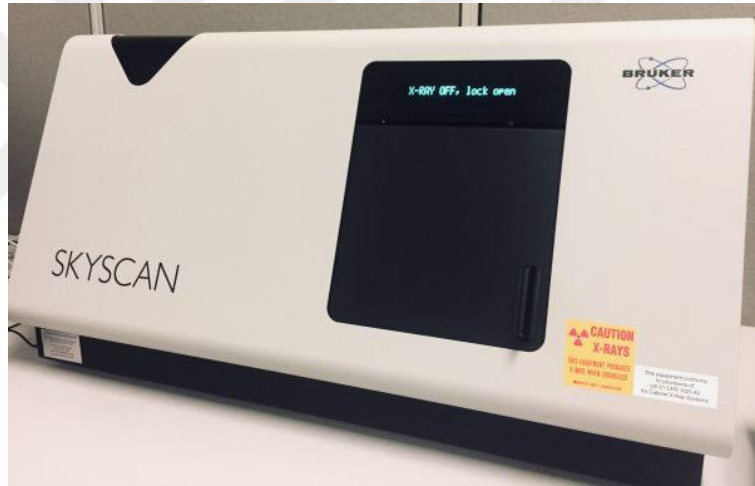


Şekil 3.8 AVN grubu bir sıçanın FBON gelişmiş femur başının, femur çıkarma işlemi sonrası görünümü.

3.3. RADYOLOJİK İNCELEME

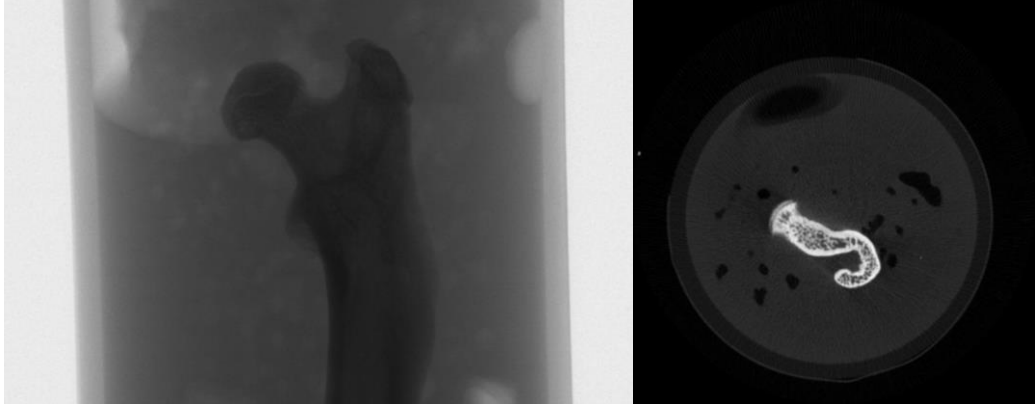
Radyolojik incelemede çıkarılan tüm femur kemikleri kaplar içerisinde açılmadan Mikro Bilgisayarlı Tomografi (Mikro BT) cihazı ile üç boyutlu tarama ve analiz için 24 örnek dört grup halinde İstanbul Üniversitesi Tıbbi ve Endüstriyel Tasarım Laboratuvarı (TETLAB)' na teslim edildi. Numuneler SkyScan 1174v2 (Kontich-Belgium) bilgisayarlı tomografi cihazında taranmak üzere hazırlandı (Şekil 3.9).

Mikro BT ile kemik mineral yoğunluğu (BMD) g/cm^3 olarak, kemik hacmi/total hacim (BV/TV), trabeküler kalınlık (Tb. Th), trabeküler sayı (Tb. N), porozite, trabeküler mesafe (Tr. Sp.), trabeküler ayrılma (Tr. Sep), trabeküler kemik modeli faktörü (Tb.Pf.) ve kemik yüzey alanı/kemik hacmi (BS/BV) ölçüldü.



Şekil 3.9 Radyolojik inceleme için kullanılan mikro BT cihazı

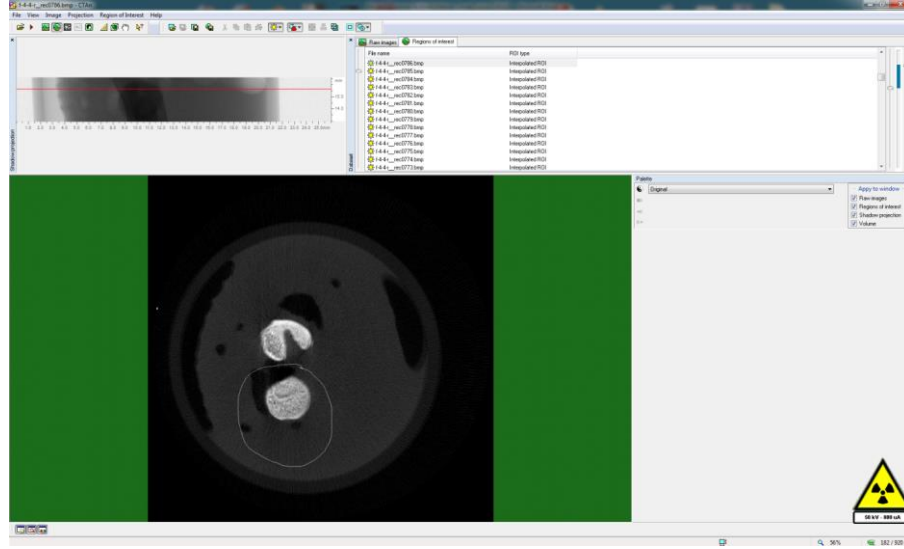
Tarama haznesi içine sabitlenen her bir örneğin tarama işlemi 50 kVp voltaj, 800 μA akım ve 40 W güç değerlerinde 0.25 mm' lik Al filtre kullanılarak gerçekleştirildi. Tarama değerleri optimize edilerek 4000 ms pozlama süresi (exposure time), 1024x1304 çözünürlük ve 19.98 μm yakınlaştırma faktörü kullanılmıştır. Her bir örnek yaklaşık 58 dakikada 0.90 derecelik rotasyon ile 360 derece taranmıştır. Tarama sonrası elde edilen TIFF formatındaki 400 ham görüntü NRecon (Ver. 1.6.10.2) programı ile yeniden yapılandırılarak BMP formatında yaklaşık 780 adet yatay kesit elde edildi. (Şekil 3.10)



Şekil 3.10 Ham görüntü ve kesit görüntüsü

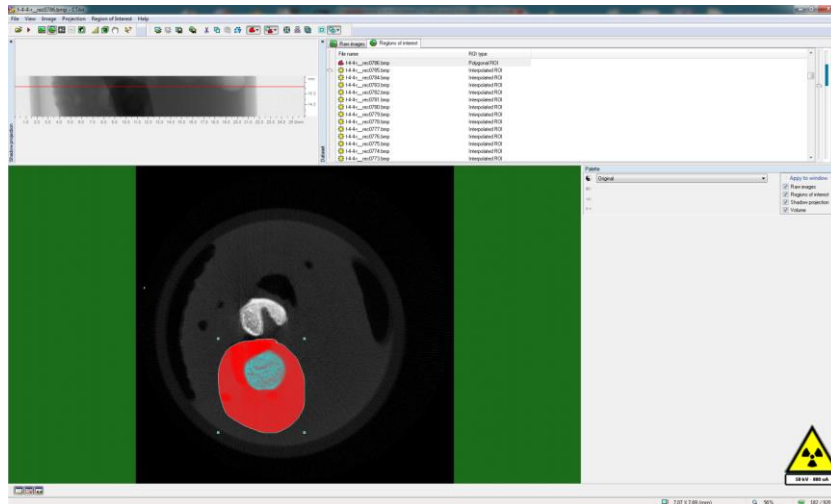
Kemik mineral yoğunluğu kalibrasyonları ilk olarak veri kümesine uygulandı. KMD analizleri kalsiyum yoğunlukları $0,25 \text{ g/mm}^3$ ve $0,75 \text{ g/mm}^3$ CaHA kalibrasyon çubuğu (fantom) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Rekonstrüksiyon sonucu elde edilen görüntüler BMP formatında kaydedilmiştir. Bu kesitler; kantitatif parametreler ve görsel modeller oluşturmak amacıyla kullanılan, densitometrik ve morfometrik ölçümlere olanak sağlayan CTAn (Ver. 1.16.4.1+) programına aktarıldı. Ölçüm yapılacak alanın sınırlarını belirlemek amacıyla; kesitler üzerinde yatay düzlemde yarı-otomatik olarak dairesel ilgili alan (Region of Interest; ROI) çizildi. (Şekil 3.11) İncelenecek örneğe ait olan vokseller ile çevresinde bulunan havanın voksellerini ayırmak için histogramda bir eşik değeri belirlendi. Siyah vokselin 0 ile belirtilip minimum yoğunluğu ifade ettiği, beyaz vokselin ise 255 ile belirtilip maksimum yoğunluğu gösterdiği histogram üzerinde eşik değeri belirlendi (Şekil 3.12). Belirlenen ROI'lar ve eşik değeri verileriyle hacimsel oranlar ayrı ayrı hesaplandı. Örneklere ait veriler CTVol (Ver. 2.3.2.0) programına aktarıldı ve örneklere ait üç boyutlu modelleme görüntüleri elde edilmiştir.



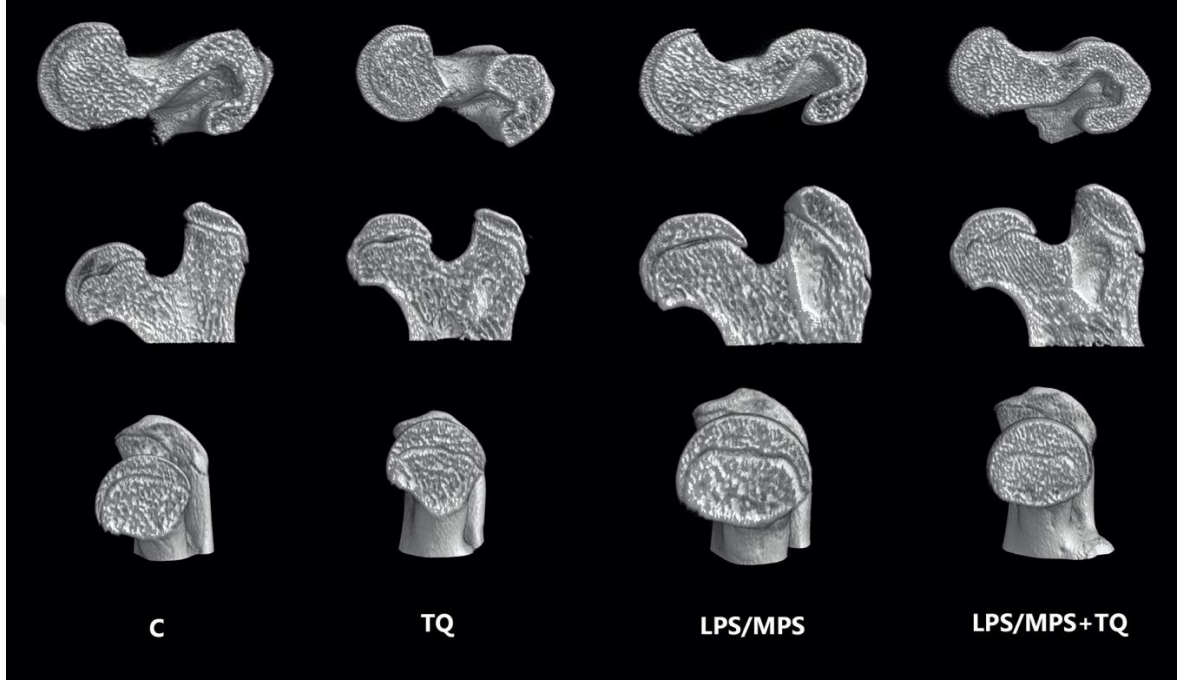
Şekil 3.11 Kesik dış etrafında ROI (Region of Interest) belirlenmesi

Yapılan taramalar sonrasında elde edilen görüntüler üzerinde femur başında oluşturulan ROI aracılığı ile kemik mineral yoğunluğu (BMD) g/cm^3 olarak, kemik hacmi/total hacim (BV/TV), trabeküler kalınlık (Tb. Th), trabeküler sayı (Tb. N), porozite, trabeküler mesafe (Tr. Sp.), trabeküler ayrılma (Tr. Sep), trabeküler kemik modeli faktörü (Tb.Pf.) ve kemik yüzey alanı/kemik hacmi (BS/BV) analizleri CTAn (Ver. 1.16.4.1+) yazılımı ile hesaplanmıştır.



Şekil 3.12 İlgili alan için eşik değeri (threshold) belirlenmesi

Bu radyolojik değerlendirmede tarama sonrası, tüm kemikler histopatolojik, histomorfometrik ve immunhistokimyasal değerlendirmeye alındı. (Şekil 3.13)



Şekil 3.13 Mikro-BT görüntüleme bulgularının gruplara göre 3 boyutlu görselleri

3.4. HİSTOPATOLOJİK ve HİSTOMORFOMETRİK İNCELEMELER

Mikro BT işlemi sonrası tüm örnekler kemik nekrozu varlığı açısından histopatolojik incelemeye tabi tutulmak üzere uzun kemiklerinden arındırılan tüm femur başları %10'luk tamponlu formol solüsyonunda bir hafta süre ile fiks edildi. Fiksasyon sonrası %10'luk formik asit solüsyonunda 3 gün süre ile dekalsifiye edildikten sonra kasetlere alındı, sonra kapalı sistem doku takip cihazında alkol, aseton, ksilen, parafin aşamalarından geçerek dehidrate edildi. Ardından parafin bloklama yapıldı. 3-4µm'lik longitudinal kesitler alınarak her bloğun birer preparatına hematoksilin-eozin (H+E) boyamaları uygulandı. Boyalı lamalar otomatik kapama sisteminde lamelle kapatıldı. Histopatolojik inceleme için Zeiss Axio ışık mikroskobu ve fotoğraflama için AxioCam IC kamera atışmanı kullanıldı. Osteonekroz varlığı, femoral baş morfolojisi, trabeküler kemiklerin morfolojisi ve kemik iliği içeriği incelendi ve gruplara arasında karşılaştırıldı. Ek olarak piknotik hücre, boş lakün ve trombuslu damalar sayılarak yüzdeleri ve ortalamaları hesaplandı ve gruplar arasında karşılaştırıldı.

Histomorfometrik ölçümler için Zeiss Axio mikroskobu Zen 2.3 lite programı ve AutoCAD 2017 (Autodesk) programı kullanıldı. Tüm parametreler literatüre ve standart terimlendirmeye uygun olarak ifade edildi.^{139,140}

Femoral baştaki toplam alan ve hacim, trabeküler kemik alanı ve hacmi, toplam çevre ve trabeküler kemik çevresi hesaplandı. Histomorfometride genel kemik yapısı için şu parametreler hesaplandı ve gruplar arasında karşılaştırmaları yapıldı:

- Kemik hacmi / toplam hacim (% BV/TV)
- Trabeküler kemik çevresi / toplam hacim (BS/TV, mm²/mm³)
- Trabeküler kemik çevresi / Kemik hacmi (BS/BV, mm²/mm³)
- Trabeküler kalınlık (Tb.Th, µm)
- Trabeküler sayı (Tb.N, mm⁻¹)

3.5. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELEME

Femur başı dokusunda hücresel (DNA) oksidatif hasarın immunohistokimyasal yöntemle incelenmesi için 8-hidroksi-20-deoksiguanosine (8-OHdG), lipid peroksidasyon düzeylerinin incelenmesi için malondialdehide (MDA), apoptoz yollarının belirlenmesi için anti-apoptotik protein Bcl-2'e ve proapoptotik protein caspase-3'e ve vasküler hasarın belirlenmesi için platelet/endotelyal hücre adezyon molekülü 1 (PECAM / CD31) ve vasküler endotelyal büyüme faktörüne (VEGF) karşı antikorlar kullanıldı. Bu işaretlenmiş monoklonal ve poliklonal antikorlar kullanılarak Streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi ile immunohistokimyasal boyama uygulandı. Bu işlem için ışık mikroskopik incelemelerde kullanılmak üzere hazırlanan parafin bloklardan, 3-4 µm kalınlığında poli-L-lizin kaplı lamalar üzerine alınan longitudinal kesitler, 58°C etüvde 1 gece süreyle deparafinize edildikten sonra, azalan dereceli alkollerle rehidrate edildi. Isı ve/veya mikrodalga ışınlama yollarıyla antijeni ortaya çıkarma işleminden sonra kesitler endojen peroksidaz aktivitesinin bloke edilmesi için %0,3'lük H₂O₂ çözeltisinde bekletildi. Daha sonra parafin kesitlerin tümü hidrofobik bir kalem ile sınırlanacak ve her bir doku kesiti, immün boyama için kullanılan kitin prosedürüne uygun olarak bloklama solüsyonunda bekletildi.

Bu işlemden sonra bloklama solüsyonu ortamdaki uzaklaştırıldı ve dokular 1 gece boyunca optimal dilüsyonda yukarıda belirtilen primer antikorlar kullanılarak +4°C' de nemli ortamda inkübe edildi. Daha sonra 0.01 M fosfat tamponlu salin (PBS-Phosphate buffered saline) ile yıkanıp 15 dk. sekonder antikorda inkübe edildi, ardından PBS ile yıkanıp 15 dk. HRP streptavidin-kompleks ile muamele edildi. Boyamalarda kromojen olarak DAB (3,3'-Diaminobenzidine) kullanıldı. PBS ile yıkama sonrası rehidrate edilen kesitler aköz kapama solüsyonu ile kapatıldı.

Spesifik immün işaretlenmenin varlığı negatif ve pozitif kontrol boyamaları ile karşılaştırmalı olarak mikroskop altında saptandı. Negatif kontrol için seçilen doku örneğinde bütün prosedür aynen uygulandı, ancak primer antikor yerine antikor dilüent kullanıldı. İlgili antijenlerle pozitif immün işaretlenme gösteren beş bölge boyanma şiddeti açısından semi-kantitatif olarak değiştirilmiş H-SCORE ile analiz edildi. Beş bölge için iki araştırmacı tarafından 0-300 arasında skorlar verildi ve

ortalamları alındı. Böylece bu proteinlerin femur başı lokalizasyonları belirlenip, proteinlerin ekspresyonlarındaki değişiklikler ve bölgesel farklılıklar semi-kantitatif olarak saptandı.¹⁴¹

3.6. BİYOKİMYASAL İNCELEME

Sakrifikasyondan hemen sonra intrakardiyak kan alınmıştır ve hematolojik değerlendirme yapılmıştır. Örnekler 3,000 rpm’de 10 dakika santrifüje edildi ve analiz edilinceye kadar -80°C’ de saklanmıştır; serum malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH), bone-alkaline phosphatase (BALP), carboxy-terminal tip 1 collagen crosslink (CTX), osteoprotegerin (OPG), trigliserid (TG), total kolesterol (TC), HDL kolesterol, LDL kolesterol düzeyleri ölçüldü.

3.6.1. Serum Malondialdehid Ölçümü

Sıçan malondialdehid (MDA) seviyeleri çift antikor sandviç teknolojisi enzim-linked immunosorbent assay (ELISA) prensibine dayanarak ölçüldü. MBS268427 katalog numaralı ELISA kiti MyBioSource, Inc (San Diego, California, USA) firmasından temin edildi. Standart ölçüm aralığı (curve range): 0.156 nmol/ml – 12 nmol/ml, minimum tespit edilebilen: 0.05 nmol/ml’dir. Tahlil içi hassasiyet $\leq$ %8, tahliller arası hassasiyet $\leq$ %12’dir

3.6.2. Serum Glutatyon Ölçümü

Sıçan glutatyon (GSH) seviyeleri ELISA prensibine dayanarak ölçüldü. MBS774706 katalog numaralı ELISA kiti MyBioSource, Inc (San Diego, California, USA) firmasından temin edildi. Standart ölçüm aralığı (curve range): 10 milimol/Litre – 400 milimol/Litre, sensivitesi: 1.0 milimol/Litre’dir. Tahlil içi CV %10’ dan az, tahliller arası CV %15’ ten azdır.

3.6.3. Serum Bone Alkaline Phosphatase Ölçümü

Sıçan BALP seviyeleri ELISA prensibine dayanarak ölçüldü. MBS774291 katalog numaralı ELISA kiti MyBioSource, Inc (San Diego, California, USA) firmasından temin edildi. Standart ölçüm aralığı (curve range): 2 ng/ml – 100 ng/ml, sensivitesi 0.1 ng/ml’dir. Tahlil içi CV %10’ den az, tahliller arası CV %15’ ten azdır.

3.6.4. Serum Crosslinked C- Telopectid of Type-1 Collagen Ölçümü

Sıçan Cros seviyeleri ELISA prensibine dayanarak ölçüldü. MBS774451 katalog numaralı ELISA kiti MyBioSource, Inc (San Diego, California, USA) firmasından temin edildi. Standart ölçüm aralığı (curve range): 1 ng/ml – 48 ng/ml, sensivitesi 1.0 ng/ml'dir. Tahlil içi CV %10' den az, tahliller arası CV %15' ten azdır.

3.6.5. Serum Osteoprotegrin Ölçümü

Sıçan osteoprotegrin (OPG) seviyeleri ELISA prensibine dayanarak ölçüldü. MBS775098 katalog numaralı ELISA kiti MyBioSource, Inc (San Diego, California, USA) firmasından temin edildi. Standart ölçüm aralığı (curve range): 1 ng/ml – 16 ng/ml, sensivitesi 0.1 ng/ml'dir. Tahlil içi CV (%) %100' den az, tahliller arası CV %15' ten azdır.

3.6.6. Serum Triglicerid Ölçümü

Sıçan triglicerid (TG) seviyeleri ELISA prensibine dayanarak ölçüldü. MBS775451 katalog numaralı ELISA kiti MyBioSource, Inc (San Diego, California, USA) firmasından temin edildi. Standart ölçüm aralığı (curve range): 0.5 milimol/Litre – 12 milimol/Litre, sensivitesi: 0.01 milimol/Litre'dir. Tahlil içi CV %10' dan az, tahliller arası CV %15' ten azdır.

3.6.7. Serum Total Kolesterol Ölçümü

Sıçan total kolesterol seviyeleri ELISA prensibine dayanarak ölçüldü. MBS775433 katalog numaralı ELISA kiti MyBioSource, Inc (San Diego, California, USA) firmasından temin edildi. Standart ölçüm aralığı (curve range): 1 mikromol/Litre – 120 mikromol/Litre, sensivitesi: 1.0 mikromol/Litre'dir. Tahlil içi CV %10' dan az, tahliller arası CV %15' ten azdır.

3.6.8. Serum HDL Kolesterol Ölçümü

Sıçan HDL kolesterol seviyeleri ELISA prensibine dayanarak ölçüldü. MBS774773 katalog numaralı ELISA kiti MyBioSource, Inc (San Diego, California, USA) firmasından temin edildi. Standart ölçüm aralığı (curve range): 50 mikromol/Litre – 1600 mikromol/Litre, sensivitesi: 10 mikromol/Litre'dir. Tahlil içi CV %10' dan az, tahliller arası CV %15' ten azdır.

3.6.9. Serum LDL Kolesterol Ölçümü

Sıçan LDL kolesterol seviyeleri ELISA prensibine dayanarak ölçüldü. MBS774933 katalog numaralı ELISA kiti MyBioSource, Inc (San Diego, California, USA) firmasından temin edildi. Standart ölçüm aralığı (curve range): 0.2 milimol/Litre – 8 milimol/Litre, sensitivitesi: 0.1 milimol/Litre'dir. Tahlil içi CV %10' dan az, tahliller arası CV %15' ten azdır.

3.7. İSTATİKSEL YÖNTEMLER

Tüm bulguların istatistikleri GraphPad Instat ver. 3.06 (GraphPad Inc, CA, ABD) bilgisayar programı ile yapıldı. Tüm numerik verilerin sonuçları ortalama $\pm$ standart sapma olarak ve tüm kategorik değişkenler mevcut hayvan sayısı / toplam hayvan sayısı olarak kaydedildi. Değişkenlerin dağılımı Kolmogorov and Smirnov testi ile test edildi. Kategorik değişkenler Chi-squared Test for Independence testi ile karşılaştırıldı. Normal dağılım gösteren numerik değişkenler one-way Analysis of Variance (ANOVA) testi ile karşılaştırıldı ve post-hoc testi olarak Tukey-Kramer çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen numerik değişkenler ise Kruskal Wallis (Nonparametric ANOVA) testi ile karşılaştırıldı ve post-hoc olarak Dunn's Multiple Comparisons Test kullanıldı. $p<0,05$, $p<0,01$ ve $p<0,001$ değerleri farklı gruplar için istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.8. ÇIKAR ÇATIŞMASI (CONFLICT OF INTEREST)

Bu tez projesine katılan tüm araştırmacılar; çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

3.9. TEŞEKKÜR VE BİLGİLENDİRME

Bu tez çalışması; Sağlık Bilimleri Üniversitesi İstanbul Bağcılar Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Döner Sermaye Kurulu'ndan bir hibe ile tamamen desteklenmiştir. (Ek 3. Tıpta Uzmanlık Eğitim Komisyonu Proje Bütçe Onay Formu)

4. BULGULAR

4.1. RADYOLOJİK BULGULAR

Femur başı osteonekroz modelinde femur başında yapılan taramalar sonrasında elde edilen radyolojik görüntüler aracılığı ile yapılan morfometrik ölçümler Tablo 4.1’de verilmiştir. Radyolojik ölçümler sonucunda bone mineral density (BMD) verilerinin ortalamasının LPS/MPS grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düştüğü ($P < 0,05$) fakat LPS/MPS + TQ grubunda yükselerek kontrol seviyelerine yaklaştığı tespit edildi (Tablo 4.1). Ayrıca porozite ortalamasının kontrol grubuna kıyasla LPS/MPS ve LPS/MPS+TQ gruplarının her ikisinde de anlamlı düzeyde arttığı (sırasıyla $P < 0,01$ ve $P < 0,05$) ancak LPS/MPS grubundaki artışın daha yüksek olduğu görüldü. Tr. Sp ve Tr. Sep verilerinin ortalamasının LPS/MPS grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede arttığı (sırasıyla $P < 0,001$ ve $P < 0,01$) fakat LPS/MPS + TQ grubunda düşerek kontrol seviyelerine yaklaştığı belirlendi (Tablo 4.1).

Radyolojik bulgulardan BV/TV ve BS/BV oranları LPS/MPS grubunda diğer gruplara kıyasla düşüş göstermesine rağmen gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farka rastlanmadı. Benzer şekilde Tb. Th, Tb. N ve Tb.Pf ortalamaları da gruplar arasında önemli bir değişiklik göstermedi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinin radyolojik bulgularının gruplara göre (n=6) dağılımı ve istatistiksel karşılaştırılması

	Kontrol	TQ	LPS/MPS	LPS/MPS+TQ	P değeri
<i>Radyolojik Bulgular</i>	<i>X ± SD</i>				
BMD (g/cm³)	0,84 ± 0,07	0,74 ± 0,09	0,71 ± 0,03*	0,79 ± 0,04	0,032
BV/TV (%)	34,97 ± 4,56	34,14 ± 11,0	26,02 ± 5,94	26,52 ± 2,89	0,072
Tb. Th (mm)	0,55 ± 0,19	0,50 ± 0,06	0,39 ± 0,04	0,43 ± 0,10	0,150
Tb. N (mm⁻¹)	61,17 ± 30,5	56,83 ± 24,5	28,93 ± 30,5	35,17 ± 18,9	0,135
Porozite (%)	66,47 ± 1,89	71,46 ± 1,58	76,30 ± 3,73**	72,99 ± 5,11*	0,0045
Tb. Sp (mm⁻¹)	0,64 ± 0,15	0,66 ± 0,06	1,57 ± 0,35***	0,86 ± 0,16	<0,0001
Tb. Sep (mm)	0,87 ± 0,16	1,07 ± 0,38	1,58 ± 0,33**,+	1,14 ± 0,15	0,0027
Tb.Pf. (mm⁻¹)	-15,11 ± 2,35	-15,06 ± 3,19	-14,63 ± 2,49	-16,15 ± 1,46	0,739
BS/BV (mm⁻¹)	6,57 ± 1,65	5,41 ± 2,48	4,79 ± 0,74	4,84 ± 0,87	0,213

X ± SS: Ortalama ± Standart Sapma, BMD: Kemik mineral yoğunluğu, BV/TV: Kemik Hacmi/Total Hacim, Tb. Th: Trabeküler Kalınlık, Tb. N.: Trabeküler Sayı, Tb. Sp: Trabeküler Mesafe, Tb. Sep.: Trabeküler Ayrılma, Tb. Pf.: Trabeküler Kemik Modeli Faktörü, BS/BV: Kemik yüzey alanı/Kemik hacmi

*P < 0,05, **P < 0,01 vs kontrol grubu;

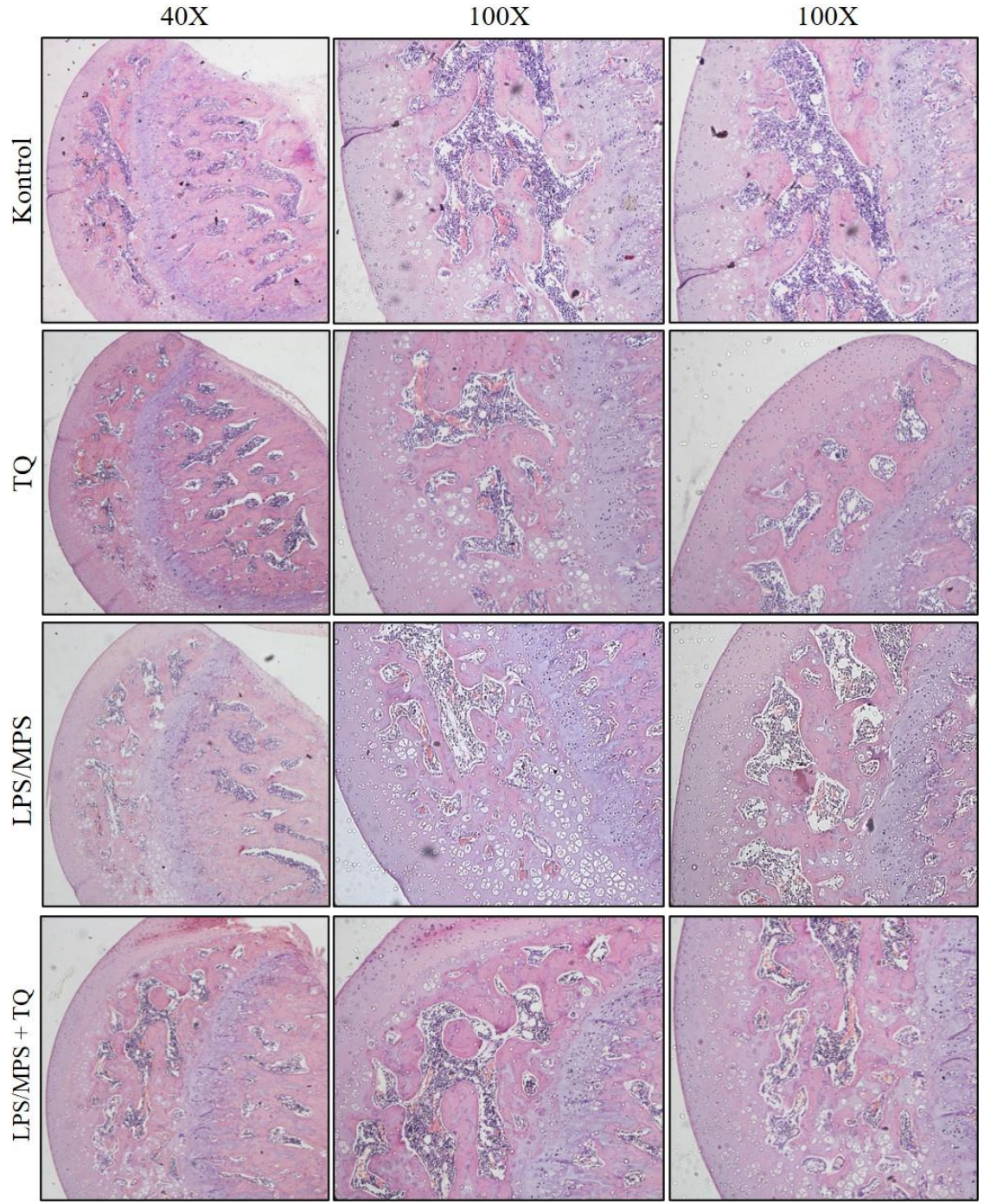
***P < 0,001 vs tüm gruplar;

+ P < 0,05 vs TQ grubu

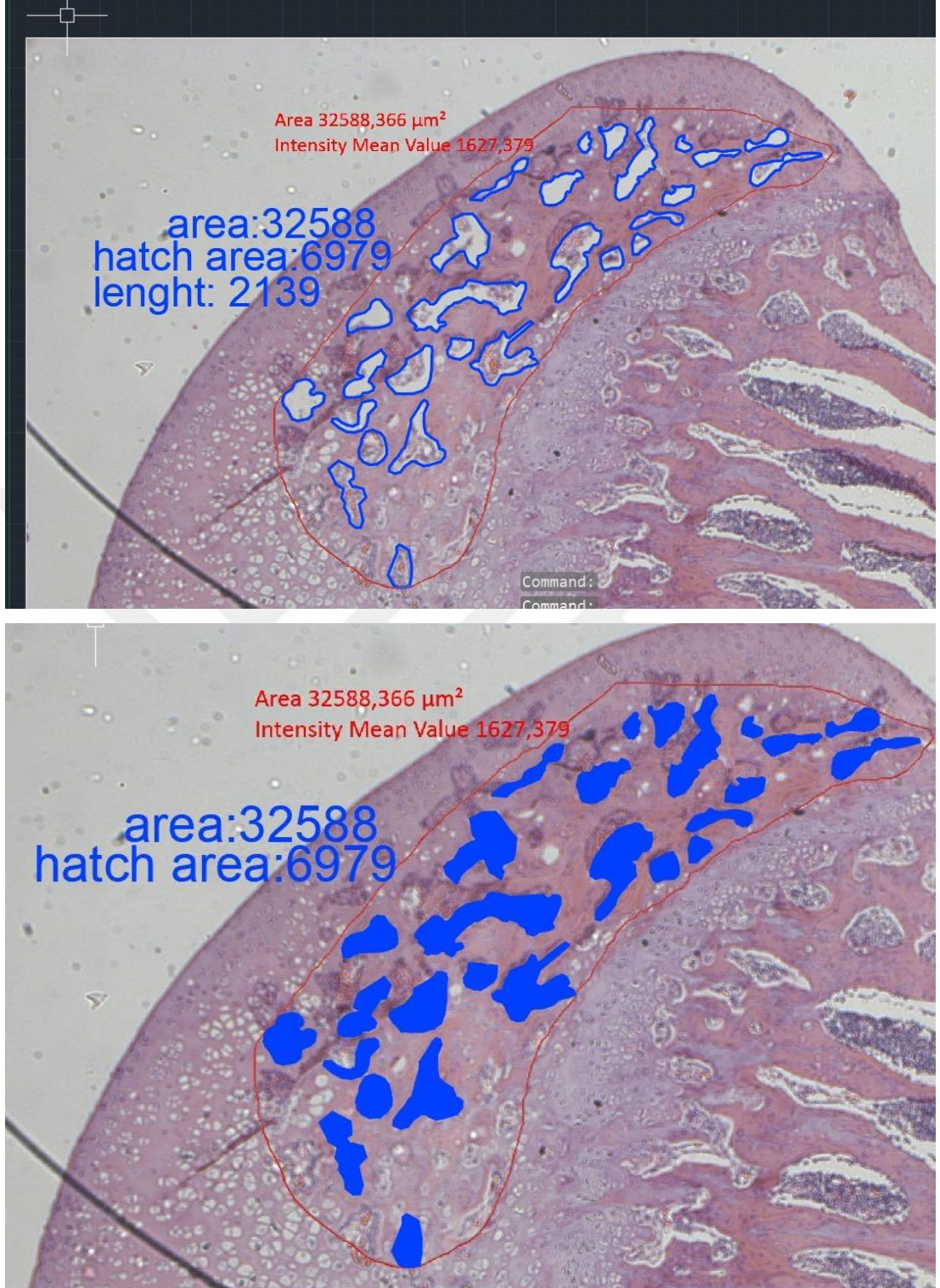
4.2. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Femur başı osteonekroz modelinde timokinonun femur başı dokusundaki histopatolojik etkilerini incelemek amacıyla her bir femur başından longitudinal olarak alınan kesitleri, Hemotoksilen ve Eozin veya Masson trikrom boyanarak ışık mikroskobu altında histolog tarafından incelendi ve fotoğraflandı (Şekil 4.1). Osteonekroz varlığı kemik trabeküllerinde boş lakünlerin veya piknotik nukleuslu osteositlerin varlığı ve difüz dağılımına eşlik eden ve ek olarak kemik iliğinde nekroz varlığıyla tanımlandı. Kontrol ve TQ grubuna kıyasla LPS/MPS grubunda, femur başında belirgin nekrotik alanlar, anomaliler ve soluk görünümlü anterolateral alanlar saptandı. Ayrıca kemik trabeküllerinin kontrol grubuna kıyasla yer yer incelmış olduğu, hayvanların çoğunda düzensiz olduğu, aralıklı yerleştikleri ve dokuda boşlukların meydana geldiği saptandı. Trabeküllerde seyrek osteositler ve çok sayıda piknotik hücreler ve boş lakünlere rastlandı. Bu gruptaki hayvanların yarısında granülasyon dokusu ve birinde fibrozis izlenirken ve apozisyona hiçbir hayvanda rastlanmadı. Yine LPS/MPS grubunda kemik iliğinin, kontrol grubuna kıyasla normal morfolojisini kaybettiği, adiposit sayısının azaldığı ve adiposit boyutlarının küçüldüğü görüldü. Bu grubun beş hayvanında kemik iliği hücrelerinin azaldığı ve buna nekroz ve hemorajinin eşlik ettiği tespit edilirken bazılarında trombus belirlendi (Şekil 4.1).

LPS/MPS+TQ grubunda; LPS/MPS grubuna kıyasla femur başında osteonekrozun ve anomalilerin azaldığı ancak soluk görünümlü anterolateral alanların benzer olduğu saptandı. Ayrıca kemik trabeküllerinin kontrol grubuna benzer şekilde bütün ve düzenli yapısını koruduğu, boşlukları ve aralıkların yok olduğu görüldü. Trabeküllerde osteosit sayısının normale döndüğü ve piknotik hücrelerin ve boş lakünlerin sayısının azaldığı tespit edildi. Bu gruptaki hayvanlarda LPS/MPS grubuna benzer şekilde granülasyon dokusuna ve fibrozise rastlanırken ve apozisyon hiçbir hayvanda görülmedi (Şekil 4.1). Tedavi grubundaki iki hayvanda kontrol grubuna benzer şekilde kemik iliğinin normal morfolojisini koruduğu, adiposit sayısı ve büyüklüklerinin arttığı görüldü. Bu grubun iki hayvanında kemik iliği hücrelerinin azaldığı ve buna trombus, nekroz ve hemorajinin eşlik ettiği belirlendi. TQ grubuna benzer şekilde bu grupta toplam dört hayvanda hematopoetik hücre nekrozuna rastlandı (Tablo 4.2).



Şekil 4.1 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinin ışık mikroskopik görüntüleri. Hematoksilen + Eozin, 40x ve 100x.



Şekil 4.2 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinin ışık mikroskopik görüntülerinde histomorfometrik ölçümlere örnekler. Trabekül çevresi ve trabekül hacmi ölçümü.

Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinin histopatolojik değerlendirmelerinin gruplara göre dağılımlarının istatistiksel karşılaştırılması Tablo 4.2’de verilmiştir. Osteonekrozun LPS/MPS grubunda diğer gruplara kıyasla anlamlı derecede artarken, LPS/MPS+TQ grubunda anlamlı derecede düştüğü tespit edildi ($P = 0,0077$). Femur başı anomalisi ise LPS/MPS grubunda iki hayvanda görüldü ve istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir farka rastlanmadı ($P = 0,242$).

Kemik trabeküllerinin histopatolojik parametreleri karşılaştırıldığında düzensiz, ince, aralıklı/boşluklu ve kırık trabeküller izlenen denek sayısı kontrol grubuna kıyasla LPS/MPS grubunda anlamlı düzeyde fazla iken LPS/MPS+TQ grubunda düşüktü ($P < 0,05$). Kontrol ve TQ gruplarında düzenli trabeküller izlenen denek sayısı diğer gruplara kıyasla anlamlı derecede yüksek bulundu ($P = 0,0148$). Granülasyon ve fibrozis açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanmadı (Tablo 4.2). LPS/MPS grubunda belirgin osteositleri barındıran trabeküllere sahip hayvan sayısı diğer gruplara kıyasla anlamlı derecede düşük iken ($P = 0,046$), seyrek osteositleri barındıran trabeküllere sahip hayvan sayısı da düşük bulundu ($P = 0,0017$).

Kemik iliğinin histopatolojik parametreleri karşılaştırıldığında TQ grubunda hematopoetik hücre sayısı artan denek sayısı, diğer gruplara kıyasla anlamlı derecede yüksek bulundu ($P = 0,0024$). LPS/MPS grubunun hiçbir hayvanında normal morfolojide kemik iliği görülmedi, çoğunda hemoraji ve nekroza rastlandı. Ek olarak çoğu hematopoetik hücre sayısı azalmış kemik iliğine sahipti ancak bu veriler gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık göstermedi (Tablo 4.2).

Trabeküllerdeki piknotik hücre, boş lakün ve trombuslu damar oranları kontrol grubuna kıyasla LPS/MPS grubunda anlamlı derecede yükselirken (sırasıyla $P = 0,0167$, $0,0158$ ve $0,0308$), LPS/MPS + TQ grubunda bu oranların düştüğü ve kontrol grubuna benzer olduğu bulundu (Tablo 4.2).

Tablo 4.2 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinin histopatolojik değerlendirmelerinin gruplara göre (n=6) dağılımı ve istatistiksel karşılaştırılması

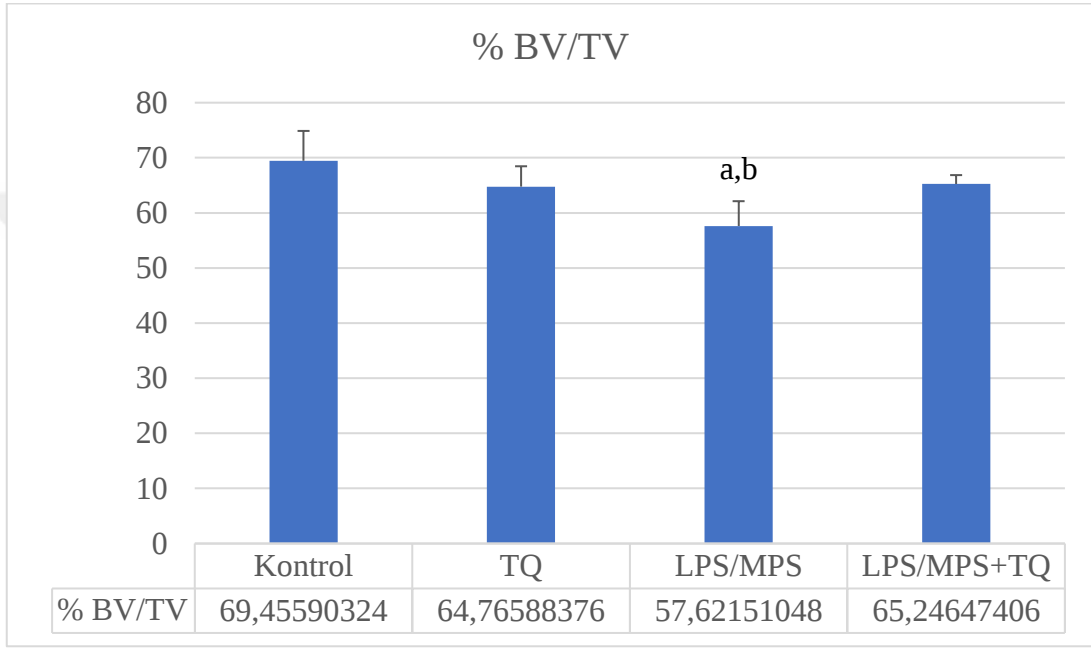
	Kontrol	TQ	LPS/MPS	LPS/MPS+TQ	P değeri
Histopatolojik Parametreler	<i>X/N</i>				
Osteonekroz	0/6	1/6	5/6	1/6	0,0077
Femur başı anomalisi	0/6	0/6	2/6	1/6	0,242
Kemik Trabekülleri					
Düzenli	6/6	5/6	1/6	4/6	0,0148
Kısmen düzenli	0/6	1/6	0/6	2/6	0,242
Düzensiz	0/6	0/6	5/6	0/6	0,003
İnce	0/6	1/6	5/6	0/6	0,0017
Aralıklı/Boşluklu	1/6	1/6	5/6	0/6	0,0077
Kırık	0/6	0/6	5/6	0/6	0,0003
Granülasyon	0/6	1/6	3/6	3/6	0,142
Fibrozis	0/6	1/6	1/6	2/6	0,494
Osteositler					
Belirgin	6/6	5/6	2/6	5/6	0,046
Seyrek	0/6	1/6	5/6	0/6	0,0017
Kemik İliği					
Normal	4/6	2/6	0/6	2/6	0,112
Artmış Adipositler	4/6	5/6	1/6	4/6	0,104
Büyük Adipositler	2/6	4/6	0/6	3/6	0,101
Hemoraj	4/6	5/6	5/6	4/6	0,828
Trombus	1/6	1/6	2/6	2/6	0,828
Makrofaj	4/6	2/6	2/6	2/6	0,561
Artmış HH	0/6	4/6	0/6	0/6	0,0024
Azalmış HH	2/6	1/6	5/6	2/6	0,104
HH Nekrozu	2/6	4/6	5/6	4/6	0,337
<i>X ± SS</i>					
Piknotik Hücre (%)	8,02 ± 5,57	16,91 ± 13,04	46,28 ± 17,97*	24,05 ± 15,75	0,0167
Boş Lakün (%)	12,4 ± 7,27	16,81 ± 7,09	24,16 ± 6,42*	20,33 ± 8,89	0,0158
Vasküler trombus (%)	9,0 ± 12,45	35,0 ± 27,53	53,33 ± 32,06*	22,22 ± 27,22	0,0308

X/N Mevcut hayvan sayısı / Toplam hayvan sayısı, *HH*: Hematopoetik hücreler, *X ± SS*: Ortalama ± Standart Sapma

**P* < 0,05 vs kontrol grubu

4.3. HİSTOMORFOMETRİK BULGULAR

Femur başı osteonekroz modelinde femur başının genel trabekül yapısının histomorfometrik indeksleri Şekil 4.3- Şekil 4.7’de verilmiştir. Kemik hacminin doku hacmine oranının ortalaması (%BV/TV) LPS/MPS grubunda, kontrol ve diğer gruplara kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu (sırasıyla $P < 0,01$ ve $P < 0,05$), LPS/MPS+TQ grubunda ise normal oranlara ulaştığı tespit edildi (Şekil 4.3).

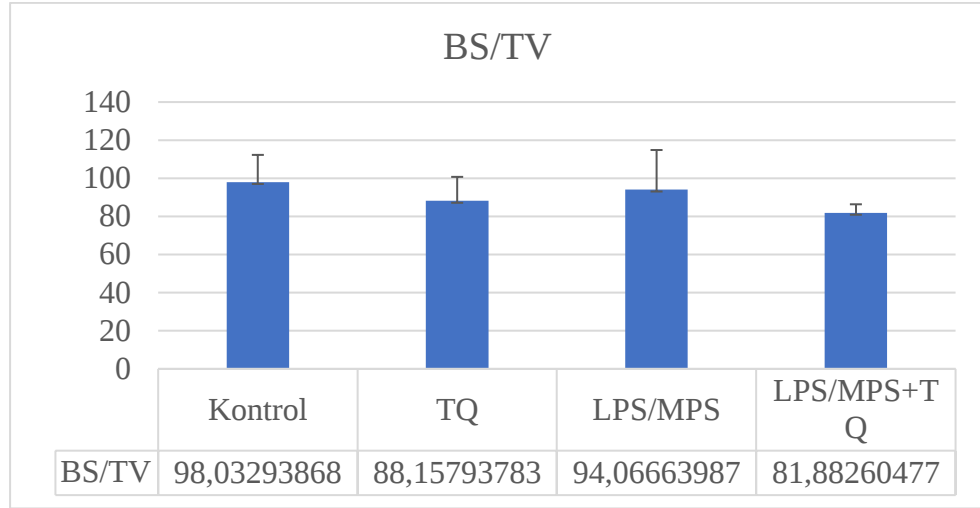


Şekil 4.3 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinin histomorfometrik bulgularından kemik hacminin doku hacmine oranlarının (%BV/TV) karşılaştırılması ($P = 0,0026$)

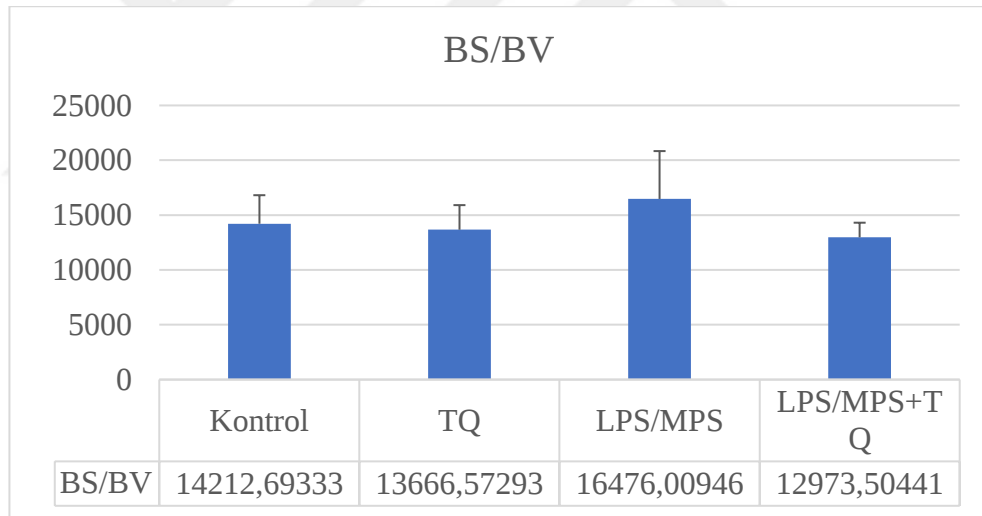
a $P < 0,01$ vs kontrol grubu

b $P < 0,05$ vs TQ ve LPS/MPS+TQ grupları

Işık mikroskopik kesitlerden elde edilen histomorfometrik bulgulardan bir diğeri olan trabeküler kemik çevresinin toplam hacme oranının (BS/TV, mm^2/mm^3) ve trabeküler kemik çevresinin kemik hacmine oranının (BS/BV, mm^2/mm^3) ortalamaları gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermediği belirlendi (sırasıyla $P = 0,342$ ve $P = 0,339$) (Şekil 4.4 ve 4.5).

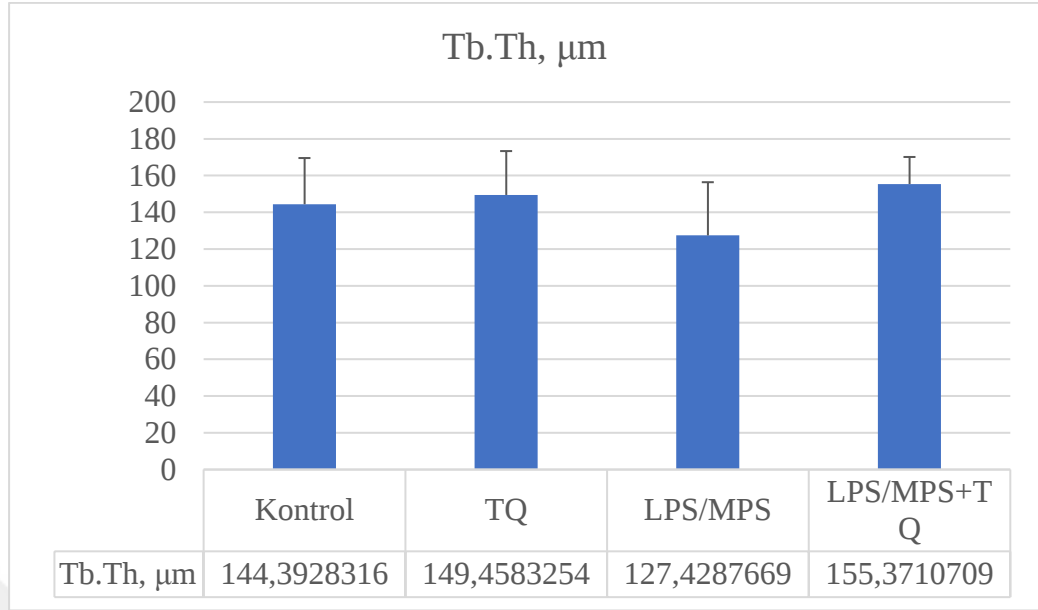


Şekil 4.4 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinin histomorfometrik bulgularından trabeküler kemik çevresinin toplam hacme oranlarının (BS/TV, mm^2/mm^3) karşılaştırılması (P = 0,342)

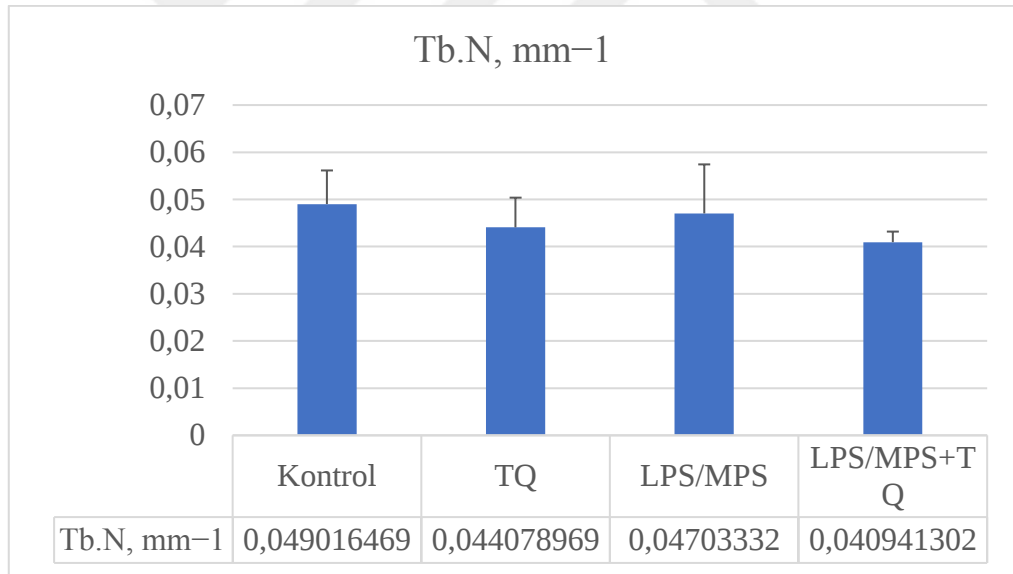


Şekil 4.5 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinin histomorfometrik bulgularından trabeküler kemik çevresinin kemik hacmine oranın (BS/BV, mm^2/mm^3) karşılaştırılması (P = 0,339)

Şekil 4.6 ve 4.7’de de görüldüğü üzere femur başı osteonekroz modelinde femur başı trabeküler kalınlıklarının (Tb.Th, μm) ve sayılarının (Tb.N, mm^{-1}) ortalamaları kontrol ve deney grupları arasında anlamlı bir farklılık göstermediği tespit edildi (sırasıyla P = 0,366 ve P = 0,326).



Şekil 4.6 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinin histomorfometrik bulgularından trabeküler kalınlıkların (Tb.Th, μm) karşılaştırılması ($P = 0,366$).



Şekil 4.7 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinin histomorfometrik bulgularından trabeküler sayıların (Tb.N, mm^{-1}) karşılaştırılması ($P = 0,326$).

4.4. İMMUNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

Femur başı dokusunda hücrel (DNA) oksidatif hasarın incelenmesi için immunohistokimyasal yöntemler kullanıldı ve 8-OHdG immünoreaktivitesi incelendi (Tablo 4.3, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9). LPS/MPS grubunda damarlar, adipositler, kemik

iliği ve trabeküllerdeki 8-OHdG düzeylerinin diğer gruplara kıyasla anlamlı derecede arttığı ($P < 0,001$) buna karşın LPS/MPS+TQ grubunda özellikle damarlar, adipositler ve kemik iliğinde normal düzeylere gerilediği tespit edildi (Şekil 4.9). Kontrol grubu ile TQ ve LPS/MPS+TQ grupları arasında anlamlı bir farka rastlanmadı (Tablo 4.3).

Lipid peroksidasyon düzeylerinin incelenmesi için MDA immünoreaktivitesi incelendi (Tablo 4.3, Şekil 4.8 ve Şekil 9) ve LPS/MPS grubunun damarlarında ve adipositlerinde MDA düzeylerinin diğer gruplara kıyasla anlamlı derecede arttığı ($P < 0,001$ ve $<0,01$) fakat kemik iliğinde değişmediği görüldü. Damarlardaki MDA düzeyi ortalaması LPS/MPS+TQ grubunda LPS/MPS grubuna kıyasla anlamlı olarak gerilemesine rağmen kontrol grubuna aralarında 10 kat bir artış tespit edildi ($P < 0,05$). LPS/MPS+TQ grubunda adipositlerdeki MDA düzeylerinde ciddi düşüşler izlenirken kemik iliğinin düzeylerinde önemli bir değişikliğe rastlanmadı (Şekil 4.9).

Tablo 4.3 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinde oksidatif hasarın ve lipid peroksidasyonun immunohistokimyasal seviyeleri ve gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırılması

	Kontrol	TQ	LPS/MPS	LPS/MPS+TQ	P değeri
<i>Parametreler</i>	<i>X ± SS</i>				
8-OHdG					
Damarlar	112,5 ± 25,0	87,5 ± 25,0	225,0 ± 28,9 ^a	100,0 ± 40,8	0,0004
Adipositler	75,0 ± 28,9	62,5 ± 25,0	175,0 ± 28,9 ^b	100,0 ± 40,8	0,0029
Kemik iliği	137,5 ± 25,0	112,5 ± 25,0	300,0 ± 0 ^a	187,5 ± 62,9	0,0003
Trabeküller	0 ± 0	6,25 ± 12,5	212,5 ± 25,0 ^c	58,75 ± 63,0	<0,0001
MDA					
Damarlar	12,5 ± 25,0	37,5 ± 47,9	250,0 ± 70,7 ^{d,e}	125,0 ± 28,9 ^f	0,0004
Adipositler	62,5 ± 25,0	75,0 ± 28,9	150,0 ± 57,7 ^{f, g}	25,0 ± 28,9	0,0051
Kemik iliği	137,5 ± 62,9	200,0 ± 40,8	225,0 ± 86,6	112,5 ± 85,4	0,131

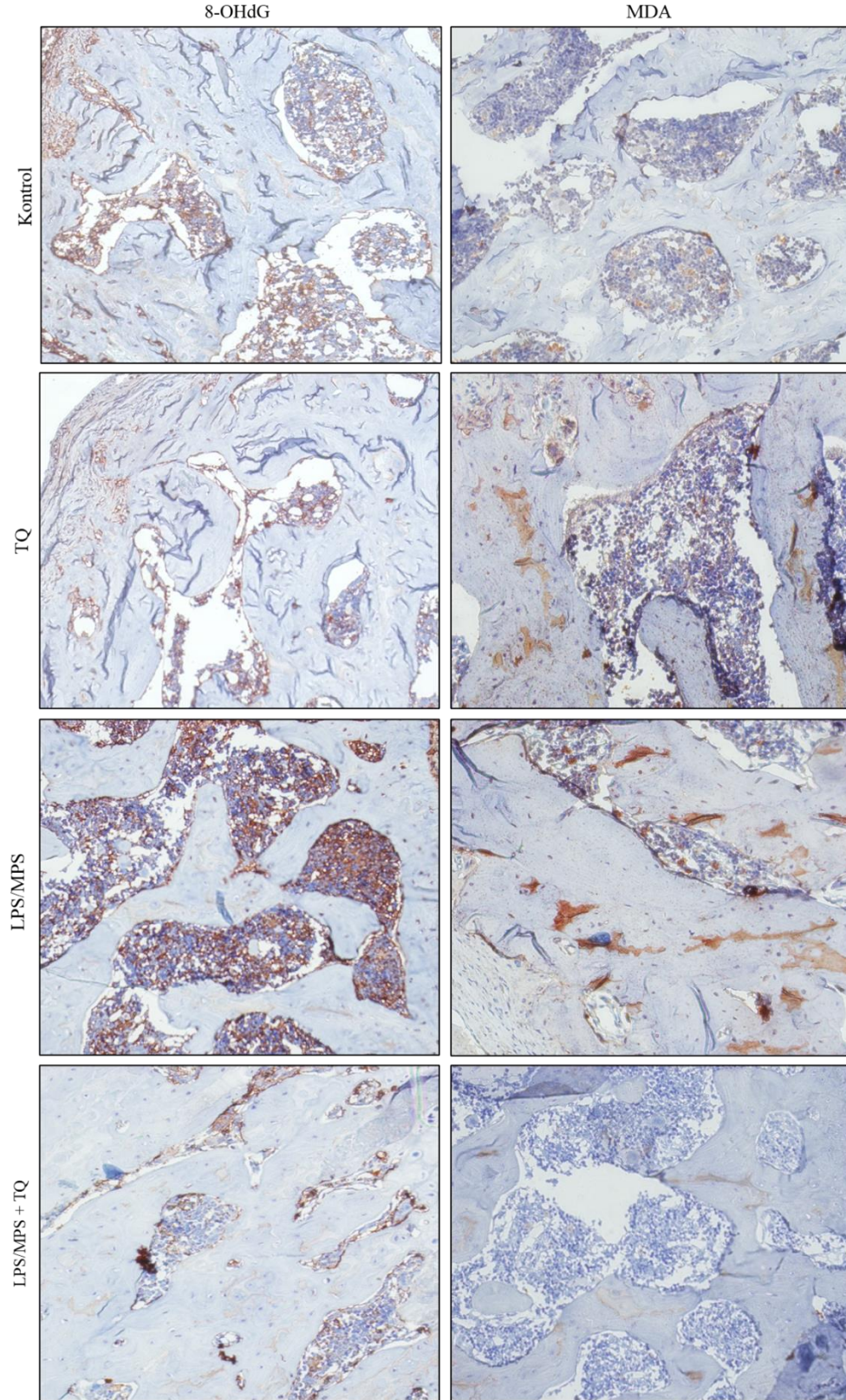
X ± SS: Ortalama ± Standart Sapma, 8-OHdG: 8-hidroksi-20-deoksiguanosine, MDA: Malondialdehyde,

a P < 0,01; b P < 0,05; c P < 0,001 vs diğer gruplar

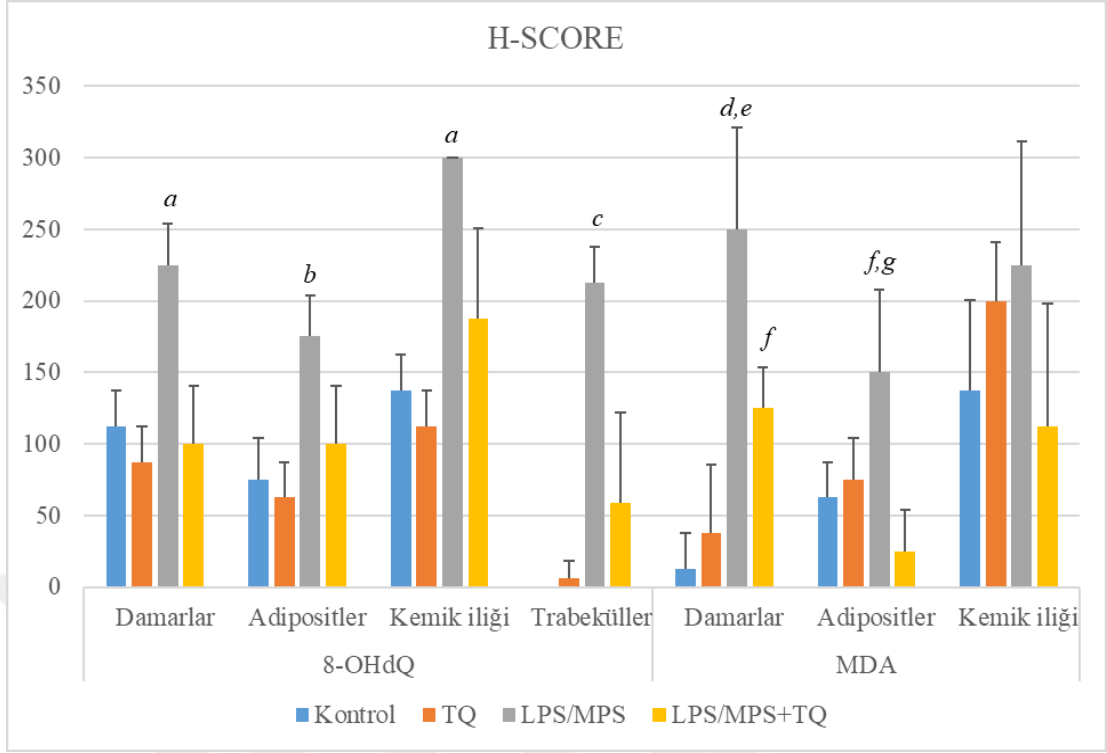
d P < 0,01 vs kontrol ve TQ grupları

e P < 0,05; g P < 0,01 vs LPS/MPS+TQ grubu

f P < 0,05 vs kontrol grubu



Şekil 4.8 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinin 8-OHdG (8-hidroksi-20-deoksiguanosine) ve MDA (Malondialdehyde) immunohistokimya analizlerinin ışık mikroskopik görüntüleri. 200x.



Şekil 4.9 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinin 8-OHdG (8-hidroksi-20-deoksiganosine) ve MDA (Malondialdehyde) immunoreaktivitelerinin değerlendirilmesi ve gruplara göre istatistiksel olarak karşılaştırılması

a P < 0,01; b P < 0,05; c P < 0,001 vs diğer gruplar

d P < 0,01 vs kontrol ve TQ grupları

e P < 0,05; g P < 0,01 vs LPS/MPS+TQ grubu

f P < 0,05 vs kontrol grubu

Femur başı dokusunda apoptoz yollarının belirlenmesi için anti-apoptotik protein olan Bcl-2 immunoreaktiviteleri incelendi (Tablo 4.4, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11). LPS/MPS grubunda adipositlerde Bcl-2 immunoreaktivitesine rastlanmazken diğer gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi ($P < 0,01$). LPS/MPS grubu kemik iliğinde Bcl-2 düzeyi oldukça düşük saptandı ve diğer gruplarla istatistiksel olarak anlamlı bir fark gösterdi ($P < 0,01$). Ancak LPS/MPS+TQ grubunda kemik iliğinde Bcl-2 düzeyi LPS/MPS grubuna kıyasla yüksek bulunmasına rağmen kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde düşüktü ($P < 0,05$). Trabeküllerde Bcl-2 düzeyleri incelendiğinde deney gruplarının tümünde kontrol grubuna kıyasla anlamlı miktarda düşük düzeylere rastlandı ($P < 0,05$) (Şekil 4.11).

Proapoptotik protein olan caspase-3 immunoreaktiviteleri incelendiğinde adipositlerde gruplar arasında istatistiksel açıdan farka rastlanmadı (Tablo 4.4, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11) fakat LPS/MPS grubunun kemik iliği ve trabeküllerinde diğer gruplara kıyasla anlamlı düzeyde artmış Caspase-3 düzeyleri tespit edildi ($P < 0,01$). LPS/MPS+TQ grubunda ise bu düzeylerin kontrol seviyelerine gerilediği bulundu. Ancak bu grubun kemik iliği caspase-3 düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla 10 kat arttığı izlendi ($P < 0,05$).

Tablo 4.4 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinde apoptozun immunohistokimyasal düzeyleri ve gruplar arasında istatistiksel karşılaştırılması

	Kontrol	TQ	LPS/MPS	LPS/MPS+TQ	P değeri
<i>Parametreler</i>	<i>X ± SS</i>				
Bcl-2					
Adipositler	25,0 ± 28,9	56,3 ± 31,5	0 ± 0 ^a	68,8 ± 27,5	0,0041
Kemik iliği	212,5 ± 25,0	137,5 ± 47,9	7,5 ± 9,6 ^a	112,5 ± 47,9 ^b	0,0003
Trabekül	237,5 ± 94,6	75,0 ± 28,9 ^b	8,5 ± 9,6 ^b	105,0 ± 61,4 ^b	0,0018
Caspase-3					
Adipositler	0 ± 0	50,0 ± 40,8	87,5 ± 47,9	75,0 ± 28,9	0,056
Kemik iliği	12,5 ± 14,4	125,0 ± 86,6 ^b	250,0 ± 40,8 ^{b,c,d}	125,0 ± 28,9 ^b	0,0006
Trabekül	25,0 ± 28,9	18,75 ± 23,9	212,5 ± 47,9 ^a	81,25 ± 37,5	0,0001

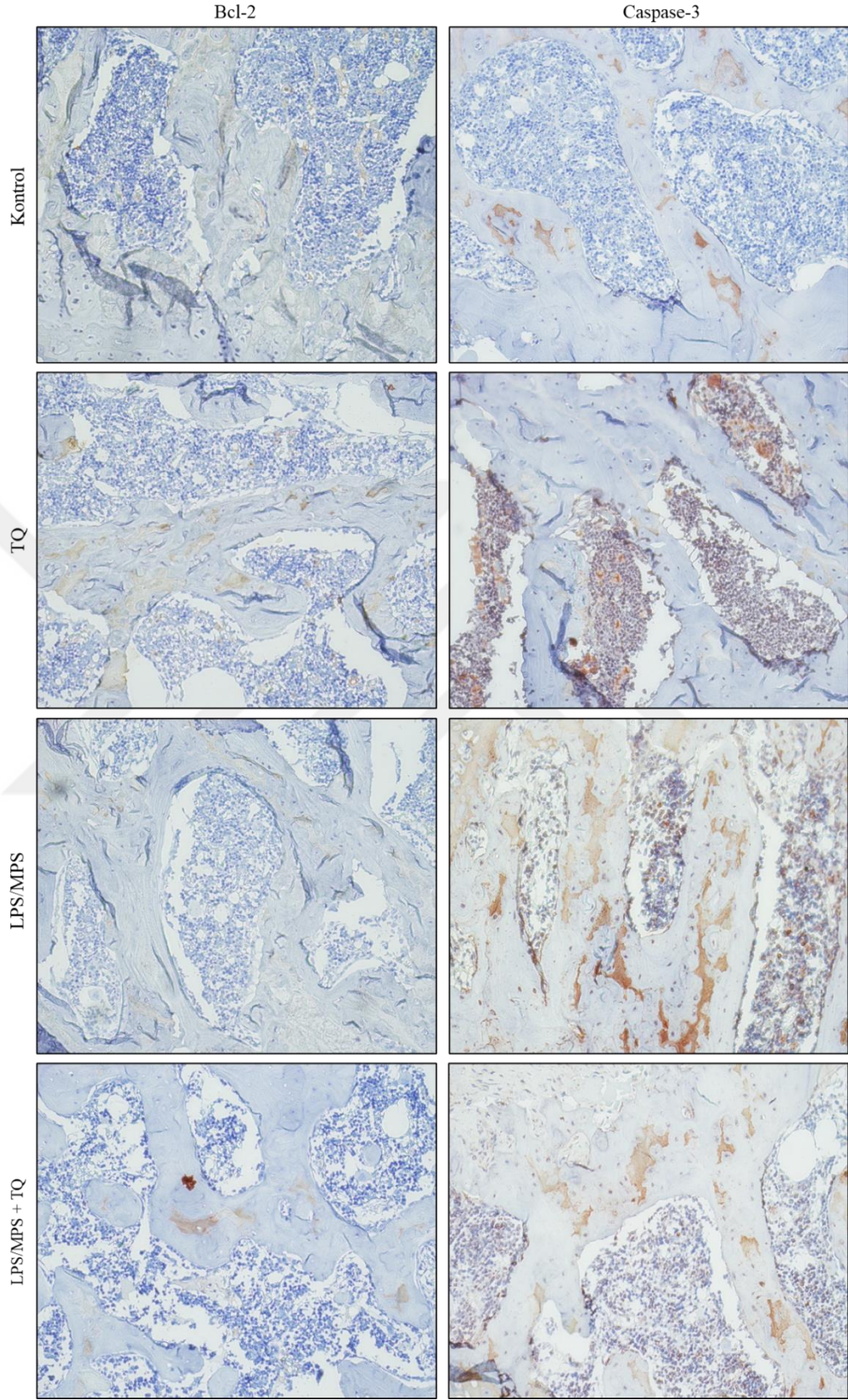
X ± SS: Ortalama ± Standart Sapma

a P < 0,01 vs diğer gruplar

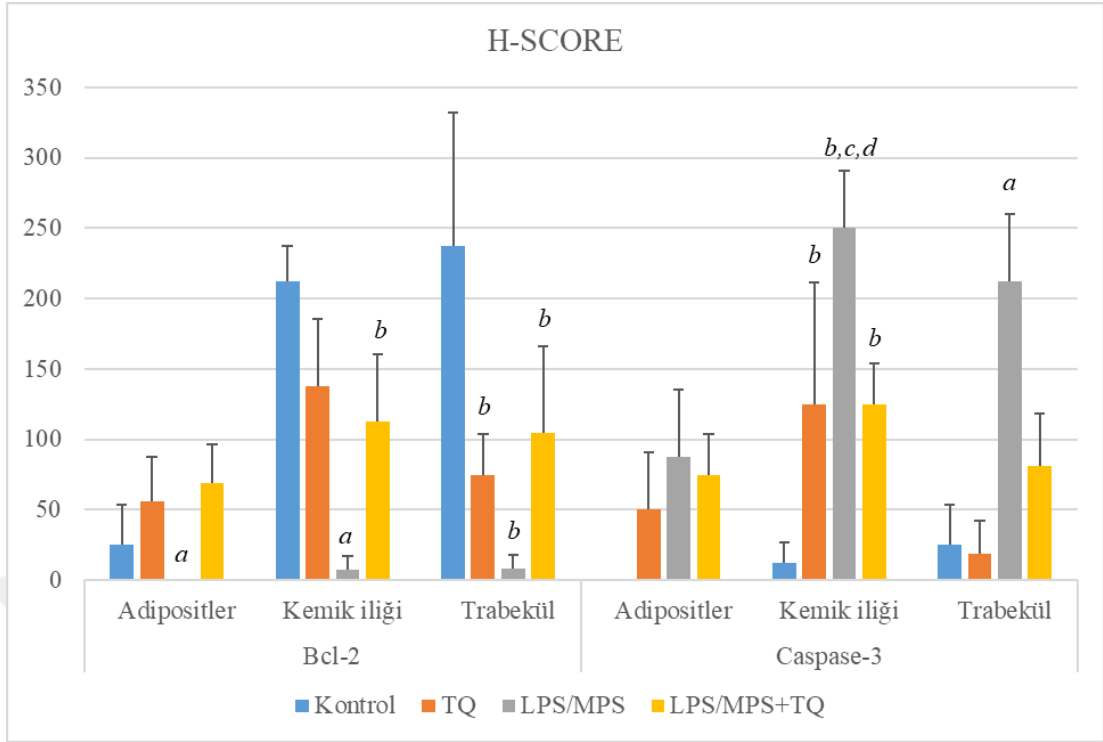
b P < 0,05 vs kontrol grubu

c P < 0,01 vs LPS/MPS+TQ grubu

d P < 0,05 vs TQ grubu



Şekil 4.10 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinin Bcl-2 ve Caspase-3 immunohistokimya analizlerinin ışık mikroskopik görüntüleri. 200x



Şekil 4.11 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinin Bcl-2 ve caspase-3 immunoreaktivitelerinin değerlendirilmesi ve gruplara göre istatistiksel olarak karşılaştırılması

a $P < 0,01$ vs diğer gruplar

b $P < 0,05$ vs kontrol grubu

c $P < 0,01$ vs LPS/MPS+TQ grubu

d $P < 0,05$ vs TQ grubu

Femur başı dokusunda vasküler hasarın belirlenmesi için PECAM / CD31 ve VEGF immunoreaktiviteleri sadece damarlarda incelendi (Tablo 4.5, Şekil 4.12 ve Şekil 4.13). PECAM/CD31 düzeyi ortalamalarının LPS/MPS grubunda düştüğü ancak gruplar arasında istatistiksel bir fark olmadığı tespit edildi ($P = 0,068$). LPS/MPS grubunda VEGF düzeyi ortalamaları diğer gruplara kıyasla anlamlı şekilde düşerken ($P = 0,0012$), LPS/MPS+TQ grubunda neredeyse normal düzeylerine ulaştığı belirlendi (Tablo 4.5, Şekil 4.12 ve Şekil 4.13).

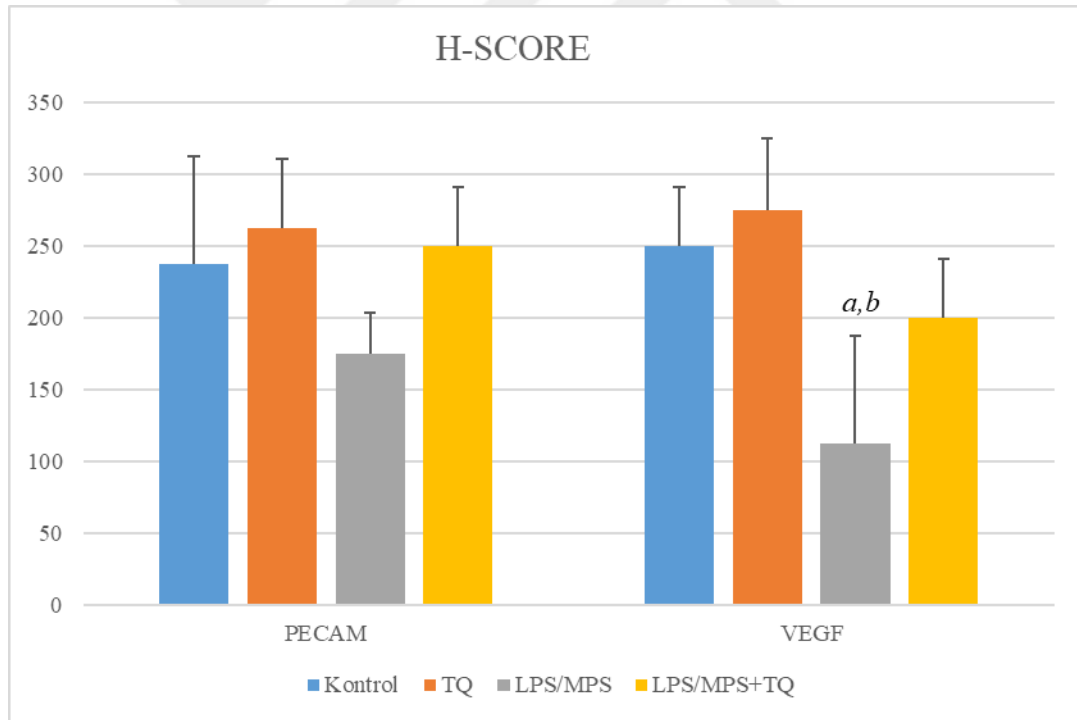
Tablo 4.5 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinde apoptozun immunohistokimyasal düzeyleri ve gruplar arasında istatistiksel karşılaştırılması

	Kontrol	TQ	LPS/MPS	LPS/MPS+TQ	P değeri
<i>Parametreler</i>	<i>X ± SS</i>				
PECAM/CD31					
Damar	237,5 ± 75,0	262,5 ± 47,9	175,0 ± 28,9	250,0 ± 40,8	0,068
VEGF					
Damar	250,0 ± 40,8	275,0 ± 50,0	112,5 ± 75,0 ^{a,b}	200,0 ± 40,8	0,0012

X ± SS: Ortalama ± Standart Sapma, PECAM/CD31: Platelet/endotelial hücre adezyon molekülü 1, VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktörü

a P < 0,01 vs kontrol ve TQ grupları

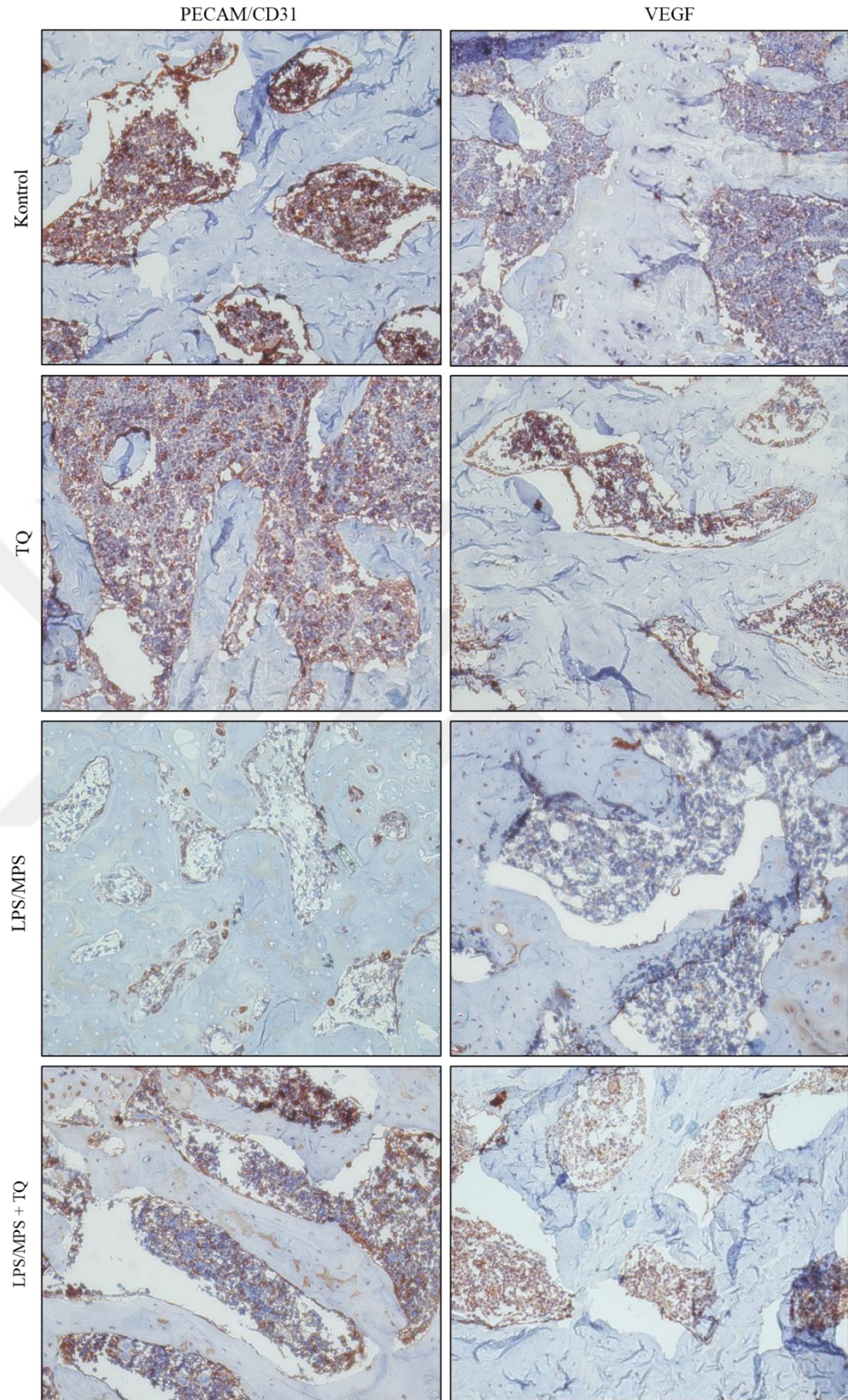
b P < 0,05 vs LPS/MPS+TQ grubu



Şekil 4.12 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinin PECAM/CD31 ve VEGF immunoreaktivitelerinin değerlendirilmesi ve gruplara göre istatistiksel olarak karşılaştırılması

a P < 0,01 vs kontrol ve TQ grupları

b P < 0,05 vs LPS/MPS+TQ grubu



Şekil 4.13 Femur başı osteonekroz modelinde femur başı kesitlerinin PECAM/CD31 (Platelet/endotelyal hücre adezyon molekülü 1) ve VEGF (Vasküler endotelyal büyüme faktörü) immunohistokimya analizlerinin ışık mikroskopik görüntüleri. 200x

4.5. BİYOKİMYASAL BULGULAR

Femur başı osteonekroz modelinde sistemik oksidatif stresi belirlemek ve buna karşı oluşturulan antioksidan mekanizmayı inceleyebilmek için sıçan serumlarında MDA ve GSH düzeyleri ELISA yöntemiyle incelendi (Tablo 4.6, Şekil 4.14). LPS/MPS grubunda MDA düzeylerinin tüm gruplara kıyasla anlamlı derecede yükseldiği belirlendi ($P < 0,001$). TQ uygulanan her iki grupta her ne kadar MDA düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla artışlar gözlense de TQ tedavisinin, özellikle LPS/MPS+TQ grubundaki MDA düzeylerini LPS/MPS grubunun serum düzeylerine kıyasla anlamlı derecede ($P < 0,01$) düşürebildiği tespit edildi (Tablo 4.6, Şekil 4.14).

LPS/MPS grubunda GSH düzeylerinin tüm gruplara kıyasla anlamlı derecede düştüğü belirlendi ($P < 0,001$). TQ uygulanan her iki grupta her ne kadar GSH düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla düşüşler gözlense de TQ tedavisinin, özellikle LPS/MPS+TQ grubundaki düzeyleri, LPS/MPS grubuna kıyasla anlamlı derecede yükseltebildiği tespit edildi ($P < 0,01$) (Tablo 4.6, Şekil 4.14).

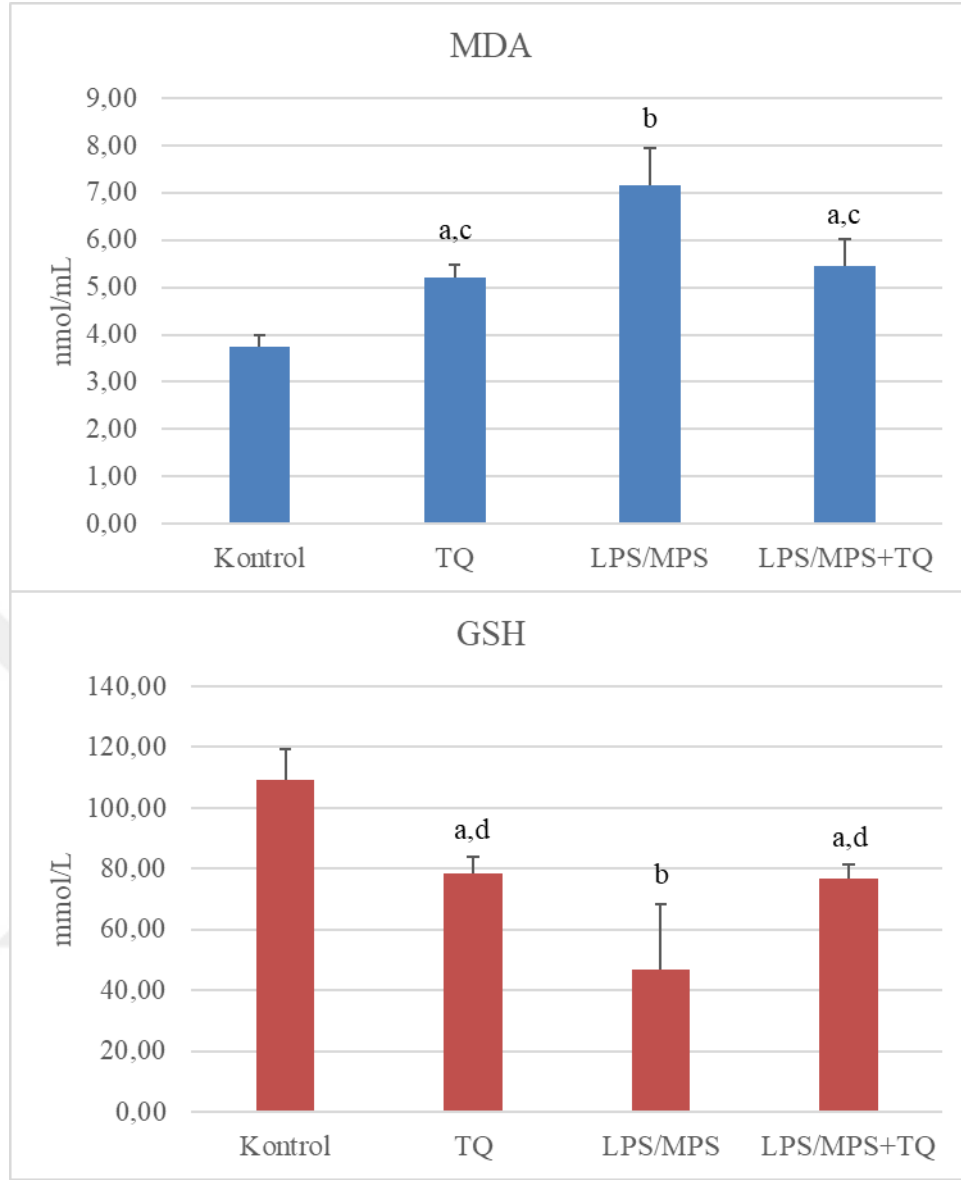
Tablo 4.6 Femur başı osteonekroz modelinde serum malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) düzeyleri ve gruplara göre karşılaştırılması

	Kontrol	TQ	LPS/MPS	LPS/MPS+TQ	P değeri
<i>Parametreler</i>	<i>X ± SS</i>				
MDA (nmol/mL)	3,74 ± 0,24	5,22 ± 0,26 ^{a,c}	7,17 ± 0,77 ^b	5,45 ± 0,58 ^{a,c}	<0,0001
GSH (mmol/L)	109,20 ± 10,18	78,33 ± 5,65 ^{a,d}	46,83 ± 21,37 ^b	76,83 ± 4,62 ^{a,d}	<0,0001

X ± SS: Ortalama ± Standart Sapma

a P < 0,01, b P < 0,001 vs kontrol grubu

c P < 0,001, d P < 0,01 vs LPS/MPS grubu



Şekil 4.14 Femur başı osteonekroz modelinde serum malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) düzeylerinin değerlendirilmesi ve gruplara göre istatistiksel olarak karşılaştırılması

a $P < 0,01$, *b* $P < 0,001$ vs kontrol grubu

c $P < 0,001$, *d* $P < 0,01$ vs LPS/MPS grubu

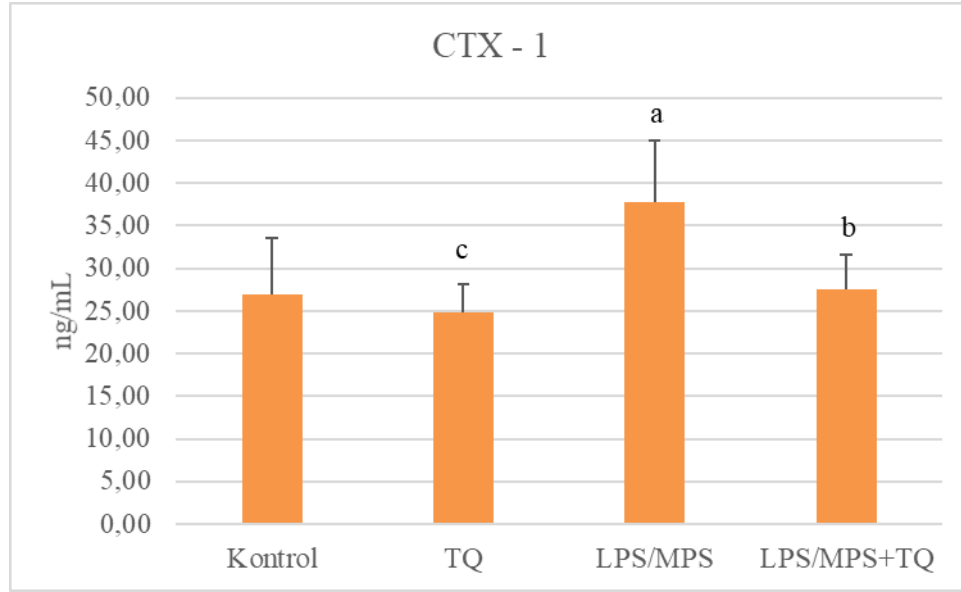
Femur başı osteonekroz modelinde TQ'nun osteoprotektif etkilerini belirlemek için sıçan serumlarında BALP, CTX ve OPG düzeyleri ELISA yöntemiyle incelendi (Tablo 4.7, Şekil 4.15). LPS/MPS grubunda serum CTX seviyesi ortalaması hem kontrol ve TQ hem de LPS/MPS+TQ grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunurken (sırasıyla $P < 0,05$, $< 0,05$ ve $< 0,01$), LPS/MPS+TQ grubunda bu ortalama kontrol seviyesine gerilemiştir. LPS/MPS grubunda her ne kadar serum BALP seviyesinin yükseldiği görülse de gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark tespit edilemedi ($P = 0,0922$). Yine LPS/MPS grubunda serum OPG seviyesi ortalaması düşük bulunmasına ve tedavi uygulandığında bu ortalama artış tespit edilmesine rağmen gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark görülemedi ($P = 0,0942$).

Tablo 4.7 Femur başı osteonekroz modelinde serum kemik alkalın fosfataz (BALP), karboksi-terminal tip 1 kollajen çapraz bağ (CTX-1), osteoprotegerin (OPG) düzeyleri ve gruplara göre karşılaştırılması

	Kontrol	TQ	LPS/MPS	LPS/MPS+TQ	P değeri
<i>Parametreler</i>	<i>X ± SS</i>				
BALP (ng/ml)	54,33 ± 3,56	52,33 ± 5,61	63,00 ± 13,51	61,00 ± 5,14	0,0922
CTX-1 (ng/ml)	27,00 ± 6,51	24,83 ± 3,25 ^c	37,80 ± 7,22 ^a	27,50 ± 4,04 ^b	0,0036
OPG (ng/ml)	2,97 ± 0,77	2,62 ± 0,59	2,06 ± 0,44	2,40 ± 0,40	0,0942

X ± SS: Ortalama ± Standart Sapma

a P < 0,05 vs kontrol grubu; b P < 0,05, c P < 0,01 vs LPS/MPS grubu



Şekil 4.15 Femur başı osteonekroz modelinde serum karboksi-terminal tip 1 kollajen çapraz bağ (CTX-1) düzeyinin değerlendirilmesi ve gruplara göre istatistiksel olarak karşılaştırılması

a P < 0,05 vs kontrol grubu; b P < 0,05, c P < 0,01 vs LPS/MPS grubu

Femur başı osteonekroz modelinde TQ'nun serum lipid profili üzerine etkilerini belirlemek için sıçan serumlarında TG, TC, HDL kolesterol, LDL kolesterol düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçüldü (Tablo 4.8). LPS/MPS grubunda serum TG, kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artarken tedavi uygulanan grupta da benzer bir artış izlendi ($P < 0,001$). Sadece TQ uygulanan gruptaki artış kontrol grubuna kıyasla yüksek olmasına rağmen ($P < 0,001$), LPS/MPS grubuna kıyasla anlamlı derecede düşüktü (sırasıyla $P < 0,001$ ve $P < 0,05$). Total kolesterol serum düzeyleri karşılaştırıldığında LPS/MPS ve LPS/MPS+TQ gruplarında diğer gruplara nazaran hafif artışlar görülmesine rağmen gruplar arasında istatistiksel bir farka rastlanmadı ($P = 0,0718$).

Serum HDL düzeyi ortalamaları LPS/MPS ve LPS/MPS+TQ gruplarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düştüğü (sırasıyla $P < 0,01$ ve $P < 0,05$), buna karşın sadece TQ grubunda ise AVN oluşturulan sıçanlara kıyasla anlamlı derecede yükseldiği bulundu (sırasıyla $P < 0,001$ ve $P < 0,05$). Aksine LDL düzeyi ortalaması

LPS/MPS ve LPS/MPS+TQ gruplarında kontrol grubuna kıyasla oldukça anlamlı derecede yükselirken ($P < 0,001$), sadece TQ uygulanan sıçanlarda ortalamanın LPS/MPS grubuna kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi ($P < 0,01$) (Tablo 4.8).

Tablo 4.8 Femur başı osteonekroz modelinde serum trigliserid (TG), total kolesterol (TC), HDL kolesterol, LDL kolesterol düzeyleri ve gruplara göre karşılaştırılması

	Kontrol	TQ	LPS/MPS	LPS/MPS+TQ	P değeri
<i>Parametreler</i>	<i>X ± SS</i>				
TG (mmol/L)	2,58 ± 0,38	4,30 ± 0,43 ^{a,b,c}	5,62 ± 0,63 ^a	5,08 ± 0,42 ^a	<0,0001
TC (μmol/L)	19,00 ± 2,24	20,17 ± 1,60	23,83 ± 4,26	21,83 ± 2,86	0,0718
HDL (μmol/L)	163,33 ± 34,16	178,00 ± 9,08 ^{b,c}	99,00 ± 15,77 ^d	117,50 ± 34,75 ^e	0,0002
LDL (mmol/L)	4,06 ± 0,36	4,73 ± 0,22 ^f	5,70 ± 0,56 ^a	5,30 ± 0,45 ^a	<0,0001

X ± SS: Ortalama ± Standart Sapma

a P < 0,001, d P < 0,01, e P < 0,05 vs kontrol grubu

b P < 0,001; f P < 0,01 vs LPS/MPS grubu

c P < 0,05 vs LPS/MPS+TQ grubu

5. TARTIŞMA

Osteonekroz (ON), ağırlıklı olarak femur başını bozan ve yavaş yavaş subkondral kemiğin kırılmasına, femur başı yüzeyinin çökmesine ve kalça eklemine tahribatına doğru ilerleyen patolojik bir süreçtir. Dünyada her yıl binlerce insanda FBON gelişmekte ve bu hastaların sayısı, özellikle steroid tedavisi ile tedavi edilenlerin sayısı yıllar içinde artmaktadır.⁴⁴ Hastalığın erken yaşta başlaması, hastaların genç yaşları boyunca kalça artroplastisi ameliyatına alınmasına ve bunun getirdiği sonuçlara katlanmalarına neden olmaktadır. ON etiyolojisi bir dizi faktöre atfedilse de glukokortikoid (steroid) uygulamaları, en sık ON gelişimiyle ilişkili predispozan nedensel faktörlerdir.⁵⁷ Çok çeşitli farmakolojik müdahalelerin AVN'e bağlı kemik kaybını ve FBON'u azalttığı gösterilmiştir. Önerilen tedaviler arasında vazodilatörler, statinler, bisfosfonatlar ve antikoagülanlar femur başını revaskülarize etmek için yer almıştır.¹⁴²⁻¹⁴⁵ Farmakolojik tedavi için mevcut çeşitli seçeneklere rağmen, şu anda bu ajanlardan herhangi birinin diğerine karşı etkinliği konusunda güçlü bir fikir birliği yoktur. Son yıllarda çeşitli alternatif terapötik yaklaşımlar dikkate alınmıştır.¹⁴⁶ Çalışmamızda sıçanlarda steroid ile indüklenmiş FBON modelinde, NS bitkisinin önemli bir aktif kimyasal bileşeni olan TQ tedavisinin antioksidan, antiosteoklastik, osteoblastik ve hipolipidemik etkilerinden faydalanarak osteonektotik alanlarda etkinliğini ve sistemik etkilerini değerlendirmek amacıyla radyolojik, histopatolojik, histomorfometrik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal analizler gerçekleştirdik.

Nigella sativa (NS) ile çeşitli araştırma grupları tarafından kapsamlı çalışmalar yapılmıştır ve farmakolojik etkilerinin antidiyabetik¹⁴⁷, antikanser, immünomodülatör¹⁴⁸, analjezik, antimikrobiyal, anti-enflamatuar, spazmolitik, bronkodilatör, hepatoprotektif, renal protektif, gastroprotektif, antioksidan özellikler içerdiği¹⁴⁹ belirlenmiştir. Bu bitkinin terapötik özelliklerinin çoğu, esans yağının önemli bir aktif kimyasal bileşeni olan TQ varlığına bağlıdır.¹³⁵ NS'nin bir bütün olarak etkisini veya sadece ana bileşeni olan TQ'nun etkisini incelemek için çeşitli deneysel çalışmalar yapılmıştır. NS ve / veya TQ'nun osteoporoz ve kemik iyileşmesi üzerinde yararlı etkileri olduğunu bildirmiştir.^{103,150-152} Bunun yanı sıra, NS'nin osteoporoz ve kemik iyileşmesi üzerindeki etkisini araştıran bazı az sayıda makale de

bulunmaktadır.^{153,154} NS uygulama süreleri 5 gün ile 10 hafta arasında değişmektedir. NS ve TQ dozu 2.5, 5 ve 10 mg / kg / gün arasında ve çoğu çalışmada oral olarak uygulanmıştır.¹⁴⁸ NS ile tedavi edilen sıçanlarda, kortikal kalınlıkta hafif bir azalma ile kemiğin yeniden modellenmesi gösterilmiş ve histolojik kesitlerde neredeyse normal osteoblastlar izlenmiştir. Ayrıca osteositlerin çoğunun normal olduğu ancak birkaç hücreyle birlikte birkaç küçük osteoporotik boşluk ve kemik onarımını gösteren bazı sement çizgileri de tespit edilmiştir.¹⁵⁰ Biz de avasküler nekroz modelinde ON varlığını kemik trabeküllerinde boş lakünlerin veya piknotik nukleuslu osteositlerin varlığı ve difüz dağılımına eşlik eden ve ek olarak kemik iliğinde nekroz varlığıyla tanımladık. LPS/MPS uygulanan sıçanların femur başlarında belirgin nekrotik alanlarla birlikte kemik trabeküllerinin yer yer incelendiğini, düzensiz ve aralıklı hale geldiğini saptadık. Trabeküllerde seyrek osteositler ve çok sayıda piknotik hücreler ve boş lakünlere rastladık. Bu gruptaki hayvanların yarısında granülasyon dokusu ve birinde fibrozis izlenirken ve apozisyona hiçbir hayvanda rastlamadık. LPS/MPS ile indüklenen ve orogastrik gavaj yolu ile 10 mg/kg/gün dozda TQ ile tedavi edilen sıçanlarda ise femur başında ON anomalilerin azaldığını, kemik trabeküllerin bütünlüğünün ve düzenli yapısının korunduğunu, boşlukların ve aralıkların yok olduğunu gösterdik. Trabeküllerde osteosit sayısının normale döndüğünü ve piknotik hücrelerin ve boş lakünlerin sayısının ve trombuslu damar oranlarının azaldığını tespit ettik. Ancak granülasyon dokusuna ve fibroze de rastladık. Bu veriler TQ'nun LPS/MPS ile indüklenen FBON hasarını doku düzeyinde düzeltmede başarılı olduğunu göstermektedir.

Klinik olarak FBON, femur başına bozulmuş kan akışı ile ilişkilidir ve bu da kemik nekrozu ve hasarına neden olur. FBON kemiğinin biyofiziksel ve ultrastrüktürel analizleri, artan karbonat- fosfat oranı ve azalan fosfat- amid oranıyla ortaya çıkan nekrotik bölgelerde trabeküler hasar, osteosit kaybı, kalsifiye kemik iliğinin varlığı ve osteoblastlarda artmış osteokalsin ekspresyonunu göstermiştir. Bunlar da kemik yeniden modellenmesinin artışına ve kemik mineral yoğunluğunun düşüşüne yol açmaktadır.¹⁵⁵ Çalışmamızda FBON ile ilişkili değişiklikler radyolojik, histopatolojik ve histomorfometrik olarak karakterize edilmiş ve TQ ile yeni bir terapötik stratejinin geliştirilmesine yardımcı olmak amaçlanmıştır. Günümüzde FBON'u saptamak için kullanılan noninvaziv tanısal testler arasında düz radyografi, MRI, BT, iskelet

sintigrafisi ve tek foton emisyonlu bilgisayarlı tomografi (SPECT) bulunmaktadır. X-ışını temelli radyografik tespit, FBON'u başlangıcında (aşama 0 ve 1) algılayacak kadar hassas değildir, erken evre FBON için genel duyarlılığı ise sadece %41'dir.¹⁵⁶ FBON'da trabeküler mimarideki değişimler morfometrik olarak mikro-BT ile kolaylıkla hesaplanabilmektedir.¹⁵⁷⁻¹⁵⁹ Huang ve ark. steroidle ilişkili FBON modelinde bir bitkisel ekstraktın majör aktif bileşeninin etkilerini araştırdıkları çalışmada mikro-BT ile kemik morfolojik değişimlerini incelemişler ve BMD' nin FBON grubunda diğer gruplara kıyasla anlamlı düzeyde düştüğünü fakat diğer trabeküler parametrelerden BV/TV, BS/TV, Tb. N, Tb. Th ve Tb. Sp parametrelerinin gruplar arasında benzer olduğunu rapor etmişlerdir.¹⁶⁰ Zheng ve ark. LPS ve MPS enjeksiyonlarıyla sıçanlarda meydana getirdikleri ON'li femur başlarındaki perfüzyonu, dekalsifikasyonu, vasküler yapıları ve trabeküler mimariyi incelemek için mikro-BT kullanmışlar ve FBON grubunda BMD, BV/TV, Tb. N değerlerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde düştüğünü ve Tb.Sp ortalamasının arttığını kaydetmişlerdir. Ancak Tb.Th değerinde değişim izlememişlerdir.¹⁶¹ Biz de çalışmamızda radyolojik görüntüleme olarak mikro-BT yöntemini seçerek femur başında trabeküler değişiklikleri üç boyutlu (3D) olarak izledik. Morfometrik ölçümler sonucunda literatürdeki birçok çalışmaya benzer şekilde BMD verilerinin ortalamasının LPS/MPS ile indüklenen FBON' da anlamlı derecede düştüğü fakat TQ ile tedavi edilen sıçanlarda yükselerek kontrol seviyelerine yaklaştığı tespit edildi. Ayrıca porozite, Tr. Sp ve Tr. Sep verilerinin ortalamasının LPS/MPS grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede arttığı fakat TQ ile tedavi edilen grupta düşerek kontrol seviyelerine yaklaştığı belirlendi. Diğer morfometrik bulgulardan BV/TV ve BS/BV oranları LPS/MPS grubunda diğer gruplara kıyasla düşüş göstermesine rağmen gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farka rastlanmadı. Benzer şekilde Tb. Th, Tb. N ve Tb.Pf ortalamaları da gruplar arasında önemli bir değişiklik göstermedi. Işık mikroskopunda iki boyutlu olarak yaptığımız histomorfometrik ölçümler sonucunda BV/TV yüzdesi LPS/MPS+TQ grubunda anlamlı düzeyde yüksek bulundu, bunun dışında ki bulgular mikro-BT bulgularımızı destekler niteliktedir.

Osteonekrozda vasküler endotelyum yaralanmasının lokal hiperkoagülasyon kapasitesi ve intravasküler trombus oluşumuna önemli bir başlangıç katkısı olduğu

yaygın olarak kabul edilmiştir.¹⁶² Sürekli kan akışına ve risk faktörlerine maruz kalan vasküler endotel hücreleri oksidatif stres nedeniyle yaralanmaya duyarlıdır.¹⁶³ Buna bağlı olarak hematopoetik hücre hasarının steroid kaynaklı ON'un erken evresinde de ortaya çıktığı gösterilmiştir.⁶⁶ Bu çalışmamızda FBON oluşturulan sıçanlarda kemik iliğinin normal morfolojisini kaybettiği, hematopoetik hücrelerin sayısının azaldığı görüldü. Bunlara nekroz ve hemorajinin eşlik ettiği tespit edilirken bazılarında trombus belirlendi. TQ ile tedavi grubunun birçok hayvanında kemik iliğinin normal morfolojisini koruduğu, hematopoetik hücre sayısının arttığı görüldü. Ancak bu grubun iki hayvanında hematopoetik nekroz da belirlendi. Bulgularımız TQ'nun, kemik iliğindeki vasküler yapıya ve hematopoetik hücelere oksidatif hasarı önleyerek ON gelişimini önlemede belirgin derecede faydalı etkilere sahip olduğunu göstermiştir.

Steroid uygulamasına bağlı oksidatif streste bir artış immünohistolojik olarak tespit edilebilir. Hem in vitro hem de in vivo veriler steroidle ilişkili oksidatif hasarın ON gelişiminde önemli bir rol oynadığını göstermiştir ve birkaç antioksidanın steroid kaynaklı ON gelişimini etkili bir şekilde baskıladığı bildirilmiştir.^{17,164,165} Steroid uygulamasından kısa bir süre sonra, koruyucu antioksidatif mekanizmaların zayıflar ve bu da kemik dokularında doku peroksidasyonuna ve protein değişikliklerine yol açar.⁶⁹ Birçok araştırmacı FBON bölgelerinde oksidatif stres saptamış veya bir antioksidan ajan tarafından osteonekrozun baskılandığını göstermiştir.^{68,166,167} Nozaki ve ark. yaptıkları çalışmada Pravastatin' in femur başında steroid ile indüklenen osteonekroza etkilerini inceledikleri çalışmada oksidatif stres değişikliklerini immünohistolojik olarak göstermiştir.¹⁶⁷ Ichiseki ve ark. FBON'un tavşanlarda ve sıçanlarda oksidatif stresin kontrol altına alınmasıyla baskılanabildiğini^{10,166} ve Kuribayashi ve ark. lipid metabolizması üzerinde etkisi olmayan bir dozda E vitamininin antioksidan etkisi ile tavşanlarda FBON'un önlenemediğini göstermişlerdir.¹⁶ Kömürcü ve ark. membran stabilizasyonunda rol oynayan güçlü bir antioksidan olan koenzim Q10'un steroide bağlı FBON'ye karşı önleyici etkisini araştırdıkları çalışmalarında MDA ve GSH düzeylerini incelemiş ve steroid uygulanan sıçanlarda 4. Haftada GSH düzeylerinde azalma ve MDA düzeylerinde artış olduğunu CoQ10 ile tedavi edilen sıçanlarda bu değişimlerin daha az belirgin olduğunu saptamışlardır.¹⁶⁸ Biz de çalışmamızda LPS uygulamasının ardından bir steroid olan

MPS ile indüklediğimiz sıçanlarda FBON modeli oluşturduk ve Nigella Sativa tohumlarının majör biyoaktif bileşiği olan TQ antioksidan etkisini araştırdık. Bu amaçla DNA oksidatif hasarını gösteren 8-OHdG immünoaktivitesini femur başı dokusunun damarları, adipositleri kemik iliği ve trabeküllerinde incelediğimizde FBON modelinde hasarın arttığını ve TQ'nun bu hasarı dokunun tüm bölümlerinde neredeyse tamamen iyileştirdiğini tespit ettik. Doku lipid peroksidasyonundan kaynaklanan ve oksidatif stresin bir biyobelirteç olarak yaygın olarak kullanılan aldehitin ana şekli olan MDA düzeylerini hem immunohistokimyasal hem de biyokimyasal yöntemlerle incelediğimizde FBON sıçanlarının damarlarında ve adipositlerinde MDA düzeylerinin diğer gruplara kıyasla anlamlı derecede arttığı ve vasküler ve adipositlerdeki MDA düzeylerinin TQ uygulamasıyla anlamlı olarak gerilediği fakat kontrol grubu düzeylerine ulaşamadığı tespit edildi. Sistemik oksidatif stresi belirlemek için serum MDA düzeylerini incelediğimizde FBON modelinde MDA düzeylerinin tüm gruplara kıyasla anlamlı derecede yükseldiği ve TQ tedavisinin, özellikle tedavi uygulanmayan FBON grubu sıçanlarına göre serum MDA düzeylerini anlamlı derecede düşürebildiği tespit edildi.

Hayvanlardaki redoks durumunu değerlendirmek için antioksidan mekanizmanın önemli biyokimyasal markeri olan GSH seviyeleri ölçülmektedir. GSH, ana hücre içi antioksidan savunmayı oluşturur ve ROS'lar da dahil olmak üzere çok çeşitli reaktif türlerin temizleyicisi olduğu gösterilmiştir.¹⁶⁹ Azalmış GSH düzeyleriyle birlikte yükselmiş MDA düzeyleri oksidatif hasarın önemli göstergeleridir.¹⁷⁰ Li ve ark. osteonekroz modeli oluşturdukları tavşanlarda steroid uygulamasından kısa bir süre sonra GSH düzeylerinde önemli bir azalma tespit etmişlerdir. Ek olarak, GSH düşüşünün serbest radikal temizleyicisi olan edaravon uygulaması ile önemli ölçüde azaltılabileceğini de göstermişlerdir.¹⁷¹ Biz de çalışmamızda LPS ve MPS kaynaklı oksidatif strese karşı oluşturulan antioksidan mekanizmanın fonksiyonunun göstergesi olan GSH' ın serum düzeylerinin FBON modelinde anlamlı derecede düştüğü ve TQ tedavisiyle bu düzeylerin anlamlı derecede arttığını belirledik. Bu veriler TQ'nun femur başında LPS ve steroid kaynaklı ON üzerinde tedavi etkisinin, lipid peroksidasyonunu ve buna bağlı oksidatif stresi engelleyerek antioksidan mekanizmayı indüklemesine bağlı olabileceğini düşündürdü.

TQ' nun daha önce oksidasyonla ilişkili çeşitli hastalıklarda oksidatif hasarı önlediği gösterildiği için^{88,125,126,128,148} bu beklenen bir sonuçtur.

Mezenkimal kök hücreler osteogenez için indüklenerek osteoblastlara diferansiye olurlar. ALP içerikleri bu diferansiyasyonun önemli bir göstergesidir ve hücrelerdeki ALP düzeyini ölçmek osteoblastların varlığını ve farklılaşma derecesini belirlemede kullanılmaktadır. ALP organofosfatı hidroliz edebilmekte ve fosfatın lokal yoğunluğunu arttırarak kalsifikasyonu başlatmaktadır.¹⁷² Osteoblastik farklılaşmanın bir göstergesi olan ALP aktivitesinin sıçanlarda steroid ile indüklenen FBON modelinde 4. hafta sonunda serumda anlamlı derecede arttığını gösteren çalışmaların yanı sıra¹⁷³ 12. haftaya kadar kemik dokusunda anlamlı derecede down-regüle olduğunu ve serum düzeylerinin de düştüğünü belirleyen çalışmalar da mevcuttur.¹⁶⁰ Osteonekrozun avasküler olaylarını düzenleyen proteinlerden ikisi kemik oluşum göstergesi olan OPG ve kemik rezorpsiyon göstergesi olan CTX'dir.¹⁷³ OPG, osteoblastlar tarafından farklılaşmaya bağlı bir şekilde salgılanan bir glikoproteindir ve RANK-L' yi düzenleyen osteoklast fonksiyonlarını ve ömrünü düzenleyen bir "tuzak reseptörü" (antagonist olarak çözünür bir reseptör) görevi görür.¹⁷⁴ Steroid uygulamasının femur başında kemik modellemesinin bir göstergesi olarak CTX düzeylerini arttırırken OPG düzeylerini düşürdüğü gösterilmiştir.¹⁷³ Çalışmamızda FBON modelinde TQ' nun kemik modellemesinde osteoprotektif etkilerini belirlemek için sıçan serumlarında BALP' ın yanı sıra CTX ve OPG düzeyleri incelediğimizde ON' li sıçanlarda her ne kadar serum BALP seviyesinin yükseldiği görülse de gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Bu sıçanların serum OPG seviyeleri düşük bulunmasına ve tedavi uygulandığında bu seviyelerde artış tespit edilmesine rağmen gruplar arasında anlamlı bir fark yine görülmemiştir. Ancak LPS/MPS sıçanların serum CTX seviyesi diğer gruplara kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunurken TQ ve LPS/MPS+TQ gruplarında anlamlı derecede kontrol grubunun seviyesine gerilemiştir.

ON' un geleneksel etiyolojik arka planını azalan vaskülarite ve kemik iskemisi temsil eder. Daha sonra azalan vaskülariteyle birlikte osteoblast ve osteosit apoptozunun indüklenen ON' un birincil etiyolojisi olduğu anlaşılmıştır.^{57,175} Son zamanlarda kortikosteroid kullanımına bağlı oluşan osteonekrozun patogenezinde

mekanizma olarak osteosit apoptozisi düşünülmektedir.^{65,66} Bekler ve ark, osteonekrozu femur başında nekrotik hücre ölümüne neden olan vasküler olmayan olaylara bağlamaktadır.¹⁷⁶ Bu avasküler olayın tetikleyicileri, glukokortikoid uygulanan osteoblastlarda TNF- α , RANK ligandı ve OPG dengesi ile ilişkili görünmektedir, bu da osteoklastların farklılaşmasını etkileyerek apoptotik olayları tetikleyebilir.¹⁷⁷ Kabata ve ark. steroidle indüklenen ON' da apoptozun rolünü ve erken evrelerinde meydana gelen hematopoetik hücre apoptozunun rolünü bildirmişlerdir.⁶⁶ Chen ve ark. sıçanlarda glukokortikoid ile indükledikleri osteonekroza, eritropoietinin etkilerini inceledikleri çalışmada, bizim çalışmamıza benzer şekilde düşük dozda LPS ve yüksek dozda MPS kullanmışlardır. Glukokortikoid uygulamasının osteoblast ve osteositlerin apoptotik indekslerini arttırdığı ve aynı zamanda proapoptotik protein olan caspase-3 immunoreaktivitesini de arttırdığını, buna karşın eritropoietinin bu etkileri düzelttiğini tespit etmişlerdir.⁵⁷ Kortikosteroide bağlı FBON nedeniyle TKA yapılan hastalarda femur başlarının patolojik incelemesinde apoptotik osteositler saptanmıştır. Bu bulgular travma ya da alkole bağlı FBON' da görülmemiştir.⁶⁷ Bu apoptotik hücrelerin birikerek osteosit-lakunar-kanalikular sistemin ve damarsal boşlukların bozulmasına ve femur başının çökmesine yol açtığı düşünülmektedir. Biz de çalışmamızda femur başı dokusunda apoptoz yollarının belirlenmesi için anti-apoptotik protein olan Bcl-2 immunoreaktiviteleri incelediğimizde LPS/MPS uygulanan sıçanların adipositlerinde, kemik iliğinde ve trabeküllerinde Bcl-2 düzeyi oldukça düşük saptadık. Buna karşın TQ tedavisinin özellikle adiposit ve kemik iliğinde Bcl-2 düzeylerini arttırdığını belirledik. LPS/MPS grubunun kemik iliğinde ve trabeküllerinde proapoptotik protein olan caspase-3 immunoreaktivitelerinin anlamlı düzeyde arttığını ve TQ tedavisi uygulanan grupta ise bu düzeylerin neredeyse kontrol seviyelerine gerilediğini gösterdik. Yukarıdaki hususlara dayanarak, TQ tedavisi ile osteoblast ve osteositlerin apoptozunun baskılanması femur başında LPS/MPS ile indüklenen ON' u önlemede etkili bir yaklaşım olabileceğini düşünüyoruz.

Literatürde bazı raporlar, sıçanların damarlarında oksidatif stres kaynaklı endotel disfonksiyonu ve iskemik değişiklikten bahsetmiştir.^{178,179} Ancak hangisinin, adipositlerde veya damarlarda oksidatif strese kaynaklı FBON'u indüklemeye daha büyük bir etkiye sahip olduğu hala açık değildir. Lokal intravasküler tromboza ve

dolaşım bozukluklarına yol açan vasküler endotelial disfonksiyon⁶⁶, ON' da oksidatif yaralanma ile birlikte ortaya çıkar.¹⁷ Vasküler endotel hasarına ek olarak, steroid uygulamasına bağlı oksidatif hasarı sürdüren hematopoetik hücreler de steroid kaynaklı ON gelişimine katkıda bulunur. Li ve ark. alışmalarında, edaravone uygulamasının, bir tavşan modelinde steroidle indüklenen ON insidansını, sadece steroid ile tedavi edilen gruptaki ile karşılaştırıldığında %73'den %20'ye düşürebildiğini rapor etmişlerdir. Steroid uygulamasını takiben edaravone tedavisi ile, hem küçük boyutlu perfüze damarlarda azalma hem de intravasküler trombüs oluşumundaki artış önemli ölçüde iyileştirildi. Bu yararlı etkiyi iki şekilde açıklamışlardır; birincisi intraosseöz vasküler sisteminin yapı işlevinin korunması ve ikincisi hematopoetik hücrelerin steroid tedavisi ile oksidatif yaralanmalardan korunması.¹⁷¹ Vasküler sistemi besleyen anjiyogenezin, kemik oluşumunun ve onarımının önemli bir düzenleyici olan VEGF ekspresyonu, osteoblast ve osteosit apoptozunun artması ile birlikte azalır.¹⁸⁰ Ayrıca, azalan VEGF ekspresyonunun, femur başının nekrotik bölgelerinde kemik yenilenmesini hasarladığı bulunmuştur.¹⁸¹ alışmamızda FBON modeli sıçanlarında vasküler sistemi incelemek için önce histopatolojik analizler daha sonra immunohistokimyasal analizler yaptık. Femur başı dokularında vasküler trombus oranları artarken TQ ile tedavi edilen sıçanlarda bu oranların düştüğü ve hatta kontrol grubuna benzer olduğunu bulduk. PECAM/CD31 düzeyi ortalamalarının LPS/MPS grubunda düştüğü, LPS/MPS+TQ grubunda yükseldiği görüldü ancak gruplar arasında istatistiksel bir fark olmadığı tespit edildi. Ayrıca femur başı dokusunda vasküler hasarın belirlenmesi için incelediğimiz VEGF immunoreaktivitelerinin LPS/MPS grubunda düşerken LPS/MPS+TQ grubunda neredeyse normal düzeylerine ulaştığını belirledik. Bu bulgular TQ' nun steroid ile indüklenmiş ON' da femur başında vasküler hasarı iyileştirmede başarılı olduğunu ve lokal arter kaynağı üzerindeki terapötik etkisini göstermektedir.

Steroid kaynaklı FBON' un patogenezi, oksidatif stresin artması, lipit metabolizması bozukluğu ve steroid hormonlarına bağlı pıhtılaşma-fibrinoliz sistemi bozukluklarını içerir.^{10,166} Dolaşım bozukluğu, lipit metabolizmasında bozulma ve artmış oksidatif stresin steroid kaynaklı FBON etiyolojisinde rol oynadığı ileri sürülmüştür. Bazı alışmalar, lipit metabolizmasının düzensizliğinin FBON' a önemli katkıda bulunanlardan biri olabileceğini göstermiştir.^{182,183} Femur başı nekrozu

modelinde cinsiyet hormonlarıyla ilgili deneysel bir çalışmada, gözlemlenen ilk değişikliğin artmış kan yağ seviyeleri olduğu ve ikinci değişikliğin kemikte meydana geldiği bulunmuştur. Bazı araştırmacılar FBON insidansının hiperlipidemili hastalarda femur boynu kırığının azalmasından sonra normal bir gruba göre anlamlı derecede yüksek olduğunu bulmuştur. Ek olarak hem TC hem de LDL' nin FBON için bağımsız risk faktörleri olduğunu göstermiştir.^{183,184} Lipit metabolizmasının düzensizliğinin neden olduğu FBON' un patojenik mekanizması ile ilgili olarak, hiperlipideminin pro-trombotik koşullar oluşturmak için vasküler endotel hücrelere zarar verdiği ve bu hücrelerin NO sentezleme yeteneğinin azalarak kemik mikrosirkülasyonunu etkileyen vasküler kontraksiyon ve gevşeme disfonksiyonu ile sonuçlandığı gösterilmiştir.^{182,185,186} Öte yandan hiperlipidemi, periferik kanda yağ emboli oluşumuna yol açar, kemik mikrovasküler tıkanıklıklarına neden olur, intraosseöz basıncı artırır ve kemik mikrosirkülasyonunun işlev bozukluğunu daha da kötüleştirir.¹⁸⁷ Hiperlipidemiye inhibe etmek için birçok ilaç, hayvanlarda ve insanlarda test edilmiştir. Bu ilaçlardan arasında yer alan statinler ve E vitamini, warfarin, düşük moleküler ağırlıklı heparin uygulamaları, FBON' un ilerlemesinin önlenmesi veya baskılanmasıyla sonuçlanmıştır.^{16,143,144,188} Bir deneysel çalışmada lipid düşürücü ajanlar olan Simvastatin ve Pravastatin, tavşanlarda steroid kaynaklı osteonekroz insidansını önemli ölçüde azalttığı görüldü.⁶³ Biz de oluşturduğumuz avasküler nekroz modelinde TQ' nun lipid profili üzerine etkilerini belirlemek için sıçan serumlarında TG, TC, HDL kolesterol, LDL kolesterol düzeyleri inceledik. FBON oluşturulan grupta serum TG ve TC düzeylerinin anlamlı derecede arttığı ancak TQ tedavisinin bu düzeyleri düşüremediğini tespit ettik. Buna karşın TQ tedavisinin LPS/MPS ile indüklenen HDL kolesterol düşüşü ve LDL kolesterol yükselişini düzelterek normal seviyelere yaklaştırdığını belirledik. Literatürde steroid ile indüklenen FBON modellerinde LDL/HDL kolesterol oranının ON gelişimi için risk faktörü olabileceği ve bu orandaki artışını kemik iliği yağ hücrelerinin büyüklüklerini de arttırabileceği rapor edilmiştir.¹⁸⁹ Bu da bulgularımızla ortaya çıkan FBON modelinde HDL kolesterol düşüşü ve LDL kolesterol yükselişini açıklamaktadır. Ayrıca TQ' nun bu değişimleri tersine çevirmesi lipid metabolizmasında kolesterol düzeylerini etkileyerek FBON' u tedavi edebileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızın bazı *sınırlamaları* vardır. İlk olarak, FBON modelinde sıçanları kullanan az sayıda çalışma vardır. Steroid kaynaklı FBON' un deneysel modelleri olarak tavşanlar, köpekler, kuşlar ve koyunlar dahil olmak üzere çeşitli hayvan türleri kullanılmıştır.¹⁹⁰ Örneğin spontan hipertansif inme eğilimli (SHRSP) sıçan kullanarak yapılan araştırmalarda bu modeldeki FBON patolojisinin insanlardaki FBON patolojisine, tavşanlara kıyasla daha yakından benzediği görülmüştür.¹⁹¹ Diğer sınırlamalarımız daha az sayıda hayvan kullanma ve sadece tek sefer kan alımı ile analiz yapmamızdır. Hayvanlar üzerinde yapılan bilimsel çalışmalarda kabul edilen 3R kuralına uymak için daha az sayıda hayvan ve uygun koşullar için daha az stimülasyon yapıldı. Çalışmamızın ilk haftasında yapılan intraperitoneal, intramuskuler enjeksiyonlar ve çalışma boyunca oral gavaj uygulaması sıçanlarda yeterince stres yaratmıştır. Bu nedenle biyokimyasal inceleme çalışmanın en sonunda yapılabilmektedir. Çalışmamızın diğer sınırlaması çalışmamızda TQ için tek bir dozaj uygulanmasıdır. Steroid ile indüklenen ON insidansını azaltmada optimal dozu belirlemek için dozlama etkisinin daha fazla araştırılması gerekir. Ayrıca, çalışmamızda tasarlanan 4 haftalık gözlem süresi, TQ tedavisinin kısa dönem etkinliğini belirlemek için kısaltılabilir.

6. SONUÇLAR

Bildiğimiz kadarıyla, literatürde FBON' un önlenmesi için TQ tedavisinin etkileri üzerine yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bulgularımız oksidatif stresin LPS ve steroid kaynaklı ON gelişiminde yakından rol oynadığını düşündürmektedir. Tüm verilerimiz sıçanlarda oluşturulan FBON modelinde LPS ve steroid kaynaklı DNA oksidatif ve lipid peroksidatif hasarın bir sonucu olarak ortaya çıkan vasküler ve hematopoetik hücre hasarlarının TQ uygulamasıyla başarılı bir şekilde azaltılabileceğini göstermiş ve bu da oksidasyonla ilişkili diğer hastalıklarda TQ' nun in vivo olarak araştırılmasına uygun olabileceğini düşündürmüştür. Hatta güvenliği kanıtlandığı takdirde insanlarda osteonekrozun önlenmesi üzerine etkilerinin klinik çalışmalarda kolaylıkla test edilebileceğine inanıyoruz.

Timokinonun geniş klinik kullanımı ve olumlu bulgularımız göz önüne alındığında, TQ uygulaması FBON' un önlenmesi için etkili ve güvenli bir strateji olabilir. Bununla birlikte, FBON nedeni çok faktörlüdür ve lipid metabolizması bozuklukları, anjiyogenezin inhibisyonu ve koagülasyon ve fibrinolitik sistemdeki anormallikler dahil ON' un gelişiminde yer alan diğer mekanizmalar için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, bu çalışmanın bulguları oksidatif stresin FBON gelişimine önemli bir katkıda bulunduğunu, güçlü bir antioksidan olan TQ' nun trabeküllerde ve kemik iliğinde ROS ve lipid peroksidatif ürünlerin birikimini azaltarak ve vasküler endotelial ve hematopoetik hücrelerde oksidatif DNA hasarını baskılayarak ON hasarını önemli ölçüde azaltılabileceğini göstermektedir. TQ tedavisi gibi invaziv olmayan bir tedavi yönteminin doğru zamanda uygulanmasının ON hastalarının hayat kalitesini arttırmak için faydalı olabileceğini düşünüyoruz.

KAYNAKÇA

1. Selby, Joe V., Friedman, Gary D., Quesenberry Charles P., Weiss, N. S. The New England Journal of Medicine Downloaded from www.nejm.org at UNIVERSITY OF MICHIGAN on December 9, 2010. For personal use only. No other uses without permission. Copyright © 1992 Massachusetts Medical Society. All rights reserved. *N. Engl. J. Med.* **326**, 653–657 (1992).
2. Baig, S. A. & Baig, M. Osteonecrosis of the Femoral Head: Etiology, Investigations, and Management. *Cureus* **10**, (2018).
3. Nagasawa, K. *et al.* Very early development of steroid-associated osteonecrosis of femoral head in systemic lupus erythematosus: Prospective study by MRI. *Lupus* (2005). doi:10.1191/0961203305lu2103oa
4. Bragge, P. *et al.* An overview of published research about the acute care and rehabilitation of traumatic brain injured and spinal cord injured patients. *J. Neurotrauma* (2012). doi:10.1089/neu.2011.2193
5. Ingvar, Å. *et al.* Immunosuppressive treatment after solid organ transplantation and risk of post-transplant cutaneous squamous cell carcinoma. *Nephrol. Dial. Transplant.* (2010). doi:10.1093/ndt/gfp425
6. Kubo, T. *et al.* Clinical and basic research on steroid-induced osteonecrosis of the femoral head in Japan. *J. Orthop. Sci.* **21**, 407–413 (2016).
7. Min, B. W., Song, K. S., Cho, C. H., Lee, S. M. & Lee, K. J. Untreated asymptomatic hips in patients with osteonecrosis of the femoral head. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **466**, 1087–1092 (2008).
8. CJ, G., RA, F., RN, F., T, T. & P, W. Hypofibrinolysis, thrombophilia, osteonecrosis. in *Clinical orthopaedics and related research* (2001).
9. Miyanishi, K. *et al.* Bone marrow fat cell enlargement and a rise in intraosseous pressure in steroid-treated rabbits with osteonecrosis. *Bone* (2002). doi:10.1016/S8756-3282(01)00663-9
10. Ichiseki, T., Matsumoto, T., Nishino, M., Kaneuji, A. & Katsuda, S. Oxidative stress and vascular permeability in steroid-induced osteonecrosis model. *J. Orthop. Sci.* (2004). doi:10.1007/s00776-004-0816-1
11. Woo, C. C., Kumar, A. P., Sethi, G. & Tan, K. H. B. Thymoquinone: Potential cure for inflammatory disorders and cancer. *Biochem. Pharmacol.* **83**, 443–451 (2012).
12. Darakhshan, S., Bidmeshki Pour, A., Hosseinzadeh Colagar, A. & Sisakhtnezhad, S. Thymoquinone and its therapeutic potentials. *Pharmacol. Res.* **95–96**, 138–158 (2015).
13. Salem, M. L. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *Int. Immunopharmacol.* **5**, 1749–1770 (2005).
14. Ozdemir, H., Kara, M. I., Erciyas, K., Ozer, H. & Ay, S. Preventive effects of thymoquinone in a rat periodontitis model: A morphometric and histopathological study. *J. Periodontal Res.* **47**, 74–80 (2012).

15. Zaoui, A. *et al.* Effects of *Nigella sativa* fixed oil on blood homeostasis in rat. *J. Ethnopharmacol.* **79**, 23–26 (2002).
16. Kuribayashi, M. *et al.* Vitamin e prevents steroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Acta Orthop.* **81**, 206–212 (2010).
17. Lu, B. B. & Li, K. H. Lipoic acid prevents steroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Rheumatol. Int.* **32**, 1679–1683 (2012).
18. Anstrom, J. A. Langman's medical embryology, 6th edition. *Surg. Neurol.* **36**, 74–75 (1991).
19. Herring, J. A. *Tachdjian 's Pediatric Orthopaedics*, Fourth Edition. (2008). doi:10.1016/B978-1-4377-1549-1.00044-1
20. Roach, K. E. & Miles, T. P. Normal hip and knee active range of motion: The relationship to age. *Phys. Ther.* (1991). doi:10.1093/ptj/71.9.656
21. Heller, M. O. *et al.* Influence of femoral anteversion on proximal femoral loading: Measurement and simulation in four patients. *Clin. Biomech.* (2001). doi:10.1016/S0268-0033(01)00053-5
22. Lenaerts, G. *et al.* Subject-specific hip geometry affects predicted hip joint contact forces during gait. *J. Biomech.* (2008). doi:10.1016/j.jbiomech.2008.01.014
23. Buller, L. T. *et al.* Relationship between proximal femoral and acetabular alignment in normal hip joints using 3-dimensional computed tomography. *Am. J. Sports Med.* (2012). doi:10.1177/0363546511424390
24. Wagner, F. V. *et al.* Capsular ligaments of the hip: Anatomic, histologic, and positional study in cadaveric specimens with MR arthrography. *Radiology* (2012). doi:10.1148/radiol.12111320
25. Elkins, J. M. *et al.* The capsule's contribution to total hip construct stability-A finite element analysis. *J. Orthop. Res.* (2011). doi:10.1002/jor.21435
26. Bardakos, N. V. & Villar, R. N. The ligamentum teres of the adult hip. *Journal of Bone and Joint Surgery - Series B* (2009). doi:10.1302/0301-620X.91B1.21421
27. Cerezal, L. *et al.* Anatomy, biomechanics, imaging, and management of ligamentum teres injuries. *Radiographics* (2010). doi:10.1148/rg.306105516
28. Bergmann, G. *et al.* Hip contact forces and gait patterns from routine activities. in *Journal of Biomechanics* (2001). doi:10.1016/S0021-9290(01)00040-9
29. Barker, P. J. *et al.* Anatomy and biomechanics of gluteus maximus and the thoracolumbar fascia at the sacroiliac joint. *Clin. Anat.* (2014). doi:10.1002/ca.22233
30. Flack, N. A. M. S., Nicholson, H. D. & Woodley, S. J. A review of the anatomy of the hip abductor muscles, gluteus medius, gluteus minimus, and tensor fascia lata. *Clinical Anatomy* (2012). doi:10.1002/ca.22004
31. Beck, M., Sledge, J. B., Gautier, E., Dora, C. F. & Ganz, R. The anatomy and function of the gluteus minimus muscle. *J. Bone Jt. Surg. - Ser. B* (2000). doi:10.1302/0301-620X.82B3.10356
32. Solomon, L. B., Lee, Y. C., Callary, S. A., Beck, M. & Howie, D. W. Anatomy of piriformis, obturator internus and obturator externus: Implications for the posterior surgical approach to the hip. *J. Bone Jt. Surg. - Ser. B* (2010). doi:10.1302/0301-620X.92B9.23893

33. Roche, J. J. W., Jones, C. D. S., Khan, R. J. K. & Yates, P. J. The surgical anatomy of the piriformis tendon, with particular reference to total hip replacement: A cadaver study. *Bone Jt. J.* (2013). doi:10.1302/0301-620X.95B6.30727
34. Blankenbaker, D. G. & Tuite, M. J. Acetabular labrum. *Magnetic Resonance Imaging Clinics of North America* (2013). doi:10.1016/j.mric.2012.09.006
35. Birnbaum, K., Prescher, A., Heßler, S. & Heller, K. D. The sensory innervation of the hip joint - An anatomical study. *Surg. Radiol. Anat.* (1997). doi:10.1007/BF01628504
36. Haversath, M. *et al.* The distribution of nociceptive innervation in the painful hip: A histological investigation. *Bone Jt. J.* (2013). doi:10.1302/0301-620X.95B6.30262
37. Zlotorowicz, M., Szczodry, M., Czubak, J. & Cisek, B. Anatomy of the medial femoral circumflex artery with respect to the vascularity of the femoral head. *J. Bone Jt. Surg. - Ser. B* (2011). doi:10.1302/0301-620X.93B11.26993
38. Gautier, E., Ganz, K., Krugel, N., Gill, T. & Ganz, R. Anatomy of the medial femoral circumflex artery and its surgical implications. *J. Bone Jt. Surg. - Ser. B* (2000). doi:10.1302/0301-620X.82B5.10426
39. Petek, D., Hannouche, D. & Suva, D. Osteonecrosis of the femoral head: Pathophysiology and current concepts of treatment. *EFORT Open Rev.* **4**, 85–97 (2019).
40. Carli, A. V. *et al.* Substrain-specific differences in bone parameters, alpha-2-macroglobulin circulating levels, and osteonecrosis incidence in a rat model. *J. Orthop. Res.* **35**, 1183–1194 (2017).
41. Rijnen, W. H. C., Lameijn, N., Schreurs, B. W. & Gardeniers, J. W. M. Total Hip Arthroplasty After Failed Treatment for Osteonecrosis of the Femoral Head. *Orthopedic Clinics of North America* (2009). doi:10.1016/j.ocl.2009.01.001
42. Assouline-Dayana, Y., Chang, C., Greenspan, A., Shoenfeld, Y. & Gershwin, M. E. Pathogenesis and natural history of osteonecrosis. *Semin. Arthritis Rheum.* (2002). doi:10.1053/sarh.2002.33724b
43. Mont, M. A. & Hungerford, D. S. Non-traumatic avascular necrosis of the femoral head. *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A* (1995). doi:10.2106/00004623-199503000-00018
44. Fukushima, W. *et al.* Nationwide epidemiologic survey of idiopathic osteonecrosis of the femoral head. *Clin. Orthop. Relat. Res.* (2010). doi:10.1007/s11999-010-1292-x
45. Felson, D. T. & Anderson, J. J. ACROSS-STUDY EVALUATION OF ASSOCIATION BETWEEN STEROID DOSE AND BOLUS STEROIDS AND AVASCULAR NECROSIS OF BONE. *Lancet* (1987). doi:10.1016/S0140-6736(87)92870-4
46. Jones, J. P. Concepts of etiology and early pathogenesis of osteonecrosis. *Instructional course lectures* (1994).
47. Mont, M. A. Symptomatic multifocal osteonecrosis: A multicenter study. *Clin. Orthop. Relat. Res.* (1999).
48. *Avascular Necrosis of the Femoral Head: Current Trends. Avascular Necrosis of the Femoral Head: Current Trends* (2004). doi:10.1007/978-88-470-2119-8

49. BOLAND, E. W. & HEADLEY, N. E. Management of rheumatoid arthritis with smaller (maintenance) doses of cortisone acetate. *J. Am. Med. Assoc.* (1950). doi:10.1001/jama.1950.02920050005002
50. Freyberg, R. H. *et al.* Problems of prolonged cortisone treatment for rheumatoid arthritis: Further investigations. *J. Am. Med. Assoc.* (1951). doi:10.1001/jama.1951.03670330030008
51. Bollet, A. J., Black, R. & Bunim, J. J. Major undesirable side-effects resulting from prednisolone and prednisone. *J. Am. Med. Assoc.* (1955). doi:10.1001/jama.1955.02960060017005
52. Schäcke, H., Döcke, W. D. & Asadullah, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacology and Therapeutics* (2002). doi:10.1016/S0163-7258(02)00297-8
53. Fisher, D. E. & Bickel, W. H. Corticosteroid-induced avascular necrosis. A clinical study of seventy-seven patients. *J. Bone Joint Surg. Am.* (1971). doi:10.2106/00004623-197153050-00002
54. McLean, C. J., Lobo, R. F. J. & Brazier, D. J. Cataracts, glaucoma, and femoral avascular necrosis caused by topical corticosteroid ointment. *The Lancet* (1995). doi:10.1016/S0140-6736(95)90324-0
55. Kubo, T. *et al.* Osteonecrosis of the femoral head that developed after long-term topical steroid application. *J. Orthop. Sci.* (2001). doi:10.1007/s007760170031
56. Weinstein, R. S. Clinical practice. Glucocorticoid-induced bone disease. *N. Engl. J. Med.* (2011). doi:10.1056/NEJMc1012926
57. Chen, S., Li, J., Peng, H., Zhou, J. & Fang, H. Administration of erythropoietin exerts protective effects against glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head in rats. *Int. J. Mol. Med.* **33**, 840–848 (2014).
58. Weinstein, R. S. Glucocorticoid-induced osteonecrosis. *Endocrine* **41**, 183–190 (2012).
59. Wang, A., Ren, M. & Wang, J. The pathogenesis of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: A systematic review of the literature. *Gene* **671**, 103–109 (2018).
60. Wang, G. J., Sweet, D. E., Reger, S. I. & Thompson, R. C. Fat-cell changes as a mechanism of avascular necrosis of the femoral head in cortisone-treated rabbits. *J. Bone Jt. Surg. - Ser. A* (1977). doi:10.2106/00004623-197759060-00003
61. Cui, Q., Wang, G. J. & Balian, G. Steroid-induced adipogenesis in a pluripotential cell line from bone marrow. *J. Bone Jt. Surg. - Ser. A* (1997). doi:10.2106/00004623-199707000-00012
62. Jones, J. P. Fat embolism and osteonecrosis. *Orthopedic Clinics of North America* (1985).
63. Iwakiri, K. *et al.* Effect of simvastatin on steroid-induced osteonecrosis evidenced by the serum lipid level and hepatic cytochrome P4503A in a rabbit model. *J. Orthop. Sci.* (2008). doi:10.1007/s00776-008-1257-z
64. Wang, G. J., Cui, Q. & Balian, G. The pathogenesis and prevention of steroid induced osteonecrosis. *Clinical Orthopaedics and Related Research* (2000). doi:10.1097/00003086-200001000-00030

65. Calder, J. D. F., Buttery, L., Revell, P. A., Pearse, M. & Polak, J. M. Apoptosis - A significant cause of bone cell death in osteonecrosis of the femoral head. *J. Bone Jt. Surg. - Ser. B* (2004). doi:10.1302/0301-620X.86B8.14834
66. Kabata, T. *et al.* Apoptotic cell death in steroid induced osteonecrosis: An experimental study in rabbits. *J. Rheumatol.* (2000).
67. Weinstein, R. S., Nicholas, R. W. & Manolagas, S. C. Apoptosis of osteocytes in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the hip. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (2000). doi:10.1210/jc.85.8.2907
68. Ichiseki, T., Matsumoto, T., Nishino, M., Kaneuji, A. & Katsuda, S. Oxidative stress and vascular permeability in steroid-induced osteonecrosis model. *J. Orthop. Sci.* **9**, 509–515 (2004).
69. Ichiseki, T. *et al.* DNA oxidation injury in bone early after steroid administration is involved in the pathogenesis of steroid-induced osteonecrosis. *Rheumatology* **44**, 456–460 (2005).
70. Bai, X. C. *et al.* Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF- κ B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2004). doi:10.1016/j.bbrc.2003.12.073
71. Cortizo, A. M., Bruzzzone, L., Molinuevo, S. & Etcheverry, S. B. A possible role of oxidative stress in the vanadium-induced cytotoxicity in the MC3T3E1 osteoblast and UMR106 osteosarcoma cell lines. *Toxicology* (2000). doi:10.1016/S0300-483X(00)00181-5
72. Zalavras, C. G. & Lieberman, J. R. Osteonecrosis of the femoral head: Evaluation and treatment. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* (2014). doi:10.5435/JAAOS-22-07-455
73. Ha, Y. C. *et al.* Prediction of collapse in femoral head osteonecrosis: A modified Kerboul method with use of magnetic resonance images. in *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A* (2006). doi:10.2106/JBJS.F.00535
74. Mont, M. A. *et al.* Systematic analysis of classification systems for osteonecrosis of the femoral head. in *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A* (2006). doi:10.2106/JBJS.F.00457
75. Moya-Angeler, J., Gianakos, A. L., Villa, J. C., Ni, A. & Lane, J. M. Current concepts on osteonecrosis of the femoral head. *World J. Orthop.* **6**, 590–601 (2015).
76. Kubo, T. *et al.* Initial MRI findings of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head in renal allograft recipients. *Magn. Reson. Imaging* (1997). doi:10.1016/S0730-725X(97)00159-8
77. Kim, Y. M., Rhyu, K. H., Lee, S. H. & Kim, H. J. Can osteonecrosis of the femoral head be recurrent? *Clin. Orthop. Relat. Res.* (2003). doi:10.1097/00003086-200301000-00020
78. Steinberg, M. E., Hayken, G. D. & Steinberg, D. S. A quantitative system for staging avascular necrosis. *J. Bone Jt. Surg. - Ser. B* (1995). doi:10.1302/0301-620x.77b1.7822393
79. Koo, K. H. & Kim, R. Quantifying the extent of osteonecrosis of the femoral head. A new method using MRI. *J. Bone Jt. Surg. - Ser. B* (1995). doi:10.1302/0301-620x.77b6.7593098
80. Aggarwal, B. B. *et al.* Potential of spice-derived phytochemicals for cancer prevention. *Planta Medica* (2008). doi:10.1055/s-2008-1074578

81. Pari, L. & Sankaranarayanan, C. Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Life Sci.* (2009). doi:10.1016/j.lfs.2009.10.021
82. Dattner, A. M. From medical herbalism to phytotherapy in dermatology: Back to the future. *Dermatologic Therapy* (2003). doi:10.1046/j.1529-8019.2003.01618.x
83. Burits, M. & Bucar, F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phyther. Res.* (2000). doi:10.1002/1099-1573(200008)14:5<323::AID-PTR621>3.0.CO;2-Q
84. Ali, B. H. & Blunden, G. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytotherapy Research* (2003). doi:10.1002/ptr.1309
85. Hosseinzadeh, H. & Parvardeh, S. Anticonvulsant effects of thymoquinone, the major constituent of *Nigella sativa* seeds, in mice. *Phytomedicine* (2004). doi:10.1078/0944-7113-00376
86. El Gazzar, M. *et al.* Anti-inflammatory effect of thymoquinone in a mouse model of allergic lung inflammation. *Int. Immunopharmacol.* (2006). doi:10.1016/j.intimp.2006.02.004
87. D'Antuono, L. F., Moretti, A. & Lovato, A. F. S. Seed yield, yield components, oil content and essential oil content and composition of *Nigella sativa* L. and *Nigella damascena* L. *Ind. Crops Prod.* (2002). doi:10.1016/S0926-6690(01)00096-6
88. Attia, A., Ragheb, A., Sylwestrowicz, T. & Shoker, A. Attenuation of high cholesterol-induced oxidative stress in rabbit liver by thymoquinone. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* (2010). doi:10.1097/MEG.0b013e328336000d
89. Cikman, O. *et al.* Radioprotective effects of *nigella sativa* oil against oxidative stress in liver tissue of rats exposed to total head irradiation. *J. Investig. Surg.* (2014). doi:10.3109/08941939.2014.898811
90. Ragheb, A. *et al.* The protective effect of thymoquinone, an anti-oxidant and anti-inflammatory agent, against renal injury: a review. *Saudi journal of kidney diseases and transplantation : an official publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia* (2009).
91. El-Dakhakhny, M., Madi, N. J., Lember, N. & Ammon, H. P. T. *Nigella sativa* oil, nigellone and derived thymoquinone inhibit synthesis of 5-lipoxygenase products in polymorphonuclear leukocytes from rats. *J. Ethnopharmacol.* (2002). doi:10.1016/S0378-8741(02)00051-X
92. Mansour, M. & Tornhamre, S. Inhibition of 5-lipoxygenase and leukotriene C4 synthase in human blood cells by thymoquinone. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* (2004). doi:10.1080/14756360400002072
93. El Mezayen, R. *et al.* Effect of thymoquinone on cyclooxygenase expression and prostaglandin production in a mouse model of allergic airway inflammation. *Immunol. Lett.* (2006). doi:10.1016/j.imlet.2006.04.012
94. Al-Ghamdi, M. S. The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa*. *J. Ethnopharmacol.* (2001). doi:10.1016/S0378-8741(01)00216-1
95. Bamosa, A. O., Ali, B. A. & Al-Hawsawi, Z. A. The effect of thymoquinone on blood lipids in rats. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* (2002).

96. Badary, O. A., Abdel-Naim, A. B., Abdel-Wahab, M. H. & Hamada, F. M. A. The influence of thymoquinone on doxorubicin-induced hyperlipidemic nephropathy in rats. *Toxicology* (2000). doi:10.1016/S0300-483X(99)00179-1
97. Al-Naqeeq, G., Ismail, M. & Yazan, L. S. Effects of thymoquinone rich fraction and thymoquinone on plasma lipoprotein levels and hepatic low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes expression. *J. Funct. Foods* (2009). doi:10.1016/j.jff.2009.06.003
98. Shoker, A., Ragheb, A., Attia, A., Elbarbry, F. & Prasad, K. Attenuated combined action of cyclosporine A and hyperlipidemia on atherogenesis in rabbits by thymoquinone. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* (2011). doi:10.1093/ecam/nep225
99. Ibrahim, R. M. *et al.* A randomised controlled trial on hypolipidemic effects of Nigella Sativa seeds powder in menopausal women. *J. Transl. Med.* (2014). doi:10.1186/1479-5876-12-82
100. Kirui, P. K. *et al.* Effects of sustained delivery of thymoquinone on bone healing of male rats. *Biomedical Sciences Instrumentation* **40**, 111–116 (2004).
101. Tekeoğlu, I., Dogan, A., Ediz, L., Budancamanak, M. & Demirel, A. Effects of thymoquinone (volatile oil of black cumin) on rheumatoid arthritis in rat models. *Phyther. Res.* (2007). doi:10.1002/ptr.2143
102. Silva, P., Vaillancourt, F. & Benderdour, M. 436 Thymoquinone Inhibits Inflammatory and Catabolic Responses and Lipid Peroxidation in Rheumatoid Arthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **17**, S232–S233 (2009).
103. Al-Enazi, M. M. Thymoquinone Attenuates Ovariectomy Induced Alteration in Bone Architecture and Metabolism in Rats. *Asian J. Med. Sci.* **7**, 8–16 (2015).
104. Abdel-Fattah, A. F. M., Matsumoto, K. & Watanabe, H. Antinociceptive effects of Nigella sativa oil and its major component, thymoquinone, in mice. *Eur. J. Pharmacol.* (2000). doi:10.1016/S0014-2999(00)00340-X
105. Al-Hader, A., Aqel, M. & Hasan, Z. Hypoglycemic effects of the volatile oil of nigella sativa seeds. *Pharm. Biol.* (1993). doi:10.3109/13880209309082925
106. Meddah, B. *et al.* Nigella sativa inhibits intestinal glucose absorption and improves glucose tolerance in rats. *J. Ethnopharmacol.* (2009). doi:10.1016/j.jep.2008.10.040
107. Fararh, K. M. *et al.* Thymoquinone reduces hepatic glucose production in diabetic hamsters. *Res. Vet. Sci.* (2005). doi:10.1016/j.rvsc.2005.01.001
108. Al-Enazi, M. M. Effect of thymoquinone on malformations and oxidative stress-induced diabetic mice. *Pakistan J. Biol. Sci.* (2007). doi:10.3923/pjbs.2007.3115.3119
109. Badary, O. A. Thymoquinone attenuates ifosfamide-induced Fanconi syndrome in rats and enhances its antitumor activity in mice. *J. Ethnopharmacol.* (1999). doi:10.1016/S0378-8741(98)00242-6
110. Kanter, M., Demir, H., Karakaya, C. & Ozbek, H. Gastroprotective activity of Nigella sativa L oil and its constituent, thymoquinone against acute alcohol-induced gastric mucosal injury in rats. *World J. Gastroenterol.* (2005). doi:10.3748/wjg.v11.i42.6662

111. Gali-Muhtasib, H., Roessner, A. & Schneider-Stock, R. Thymoquinone: A promising anti-cancer drug from natural sources. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**, 1249–1253 (2006).
112. El-Abhar, H. S., Abdallah, D. M. & Saleh, S. Gastroprotective activity of *Nigella sativa* oil and its constituent, thymoquinone, against gastric mucosal injury induced by ischaemia/reperfusion in rats. *J. Ethnopharmacol.* **84**, 251–258 (2003).
113. Abdel-Sater, K. A. Gastroprotective effects of *Nigella Sativa* oil on the formation of stress gastritis in hypothyroidal rats. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* (2009).
114. Mansour, M. A. Protective effects of thymoquinone and desferrioxamine against hepatotoxicity of carbon tetrachloride in mice. *Life Sci.* (2000). doi:10.1016/S0024-3205(00)00592-0
115. Alsaif, M. A. Effect of thymoquinone on ethanol-induced hepatotoxicity in wistar rats. *J. Med. Sci.* (2007). doi:10.3923/jms.2007.1164.1170
116. Mahmoud, M. R., El-Abhar, H. S. & Saleh, S. The effect of *Nigella sativa* oil against the liver damage induced by *Schistosoma mansoni* infection in mice. *J. Ethnopharmacol.* (2002). doi:10.1016/S0378-8741(01)00310-5
117. El-Mahmoudy, A. *et al.* Thymoquinone suppresses expression of inducible nitric oxide synthase in rat macrophages. *Int. Immunopharmacol.* (2002). doi:10.1016/S1567-5769(02)00139-X
118. Awad, E., Austin, D. & Lyndon, A. R. Effect of black cumin seed oil (*Nigella sativa*) and nettle extract (Quercetin) on enhancement of immunity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture* (2013). doi:10.1016/j.aquaculture.2013.01.008
119. Assayed, M. E. Radioprotective effects of black seed (*Nigella sativa*) oil against hemopoietic damage and immunosuppression in gamma-irradiated rats. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* (2010). doi:10.3109/08923970903307552
120. Dey, D., Ray, R. & Hazra, B. Antitubercular and antibacterial activity of quinonoid natural products against multi-drug resistant clinical isolates. *Phyther. Res.* (2014). doi:10.1002/ptr.5090
121. Zaoui, A. *et al.* Diuretic and hypotensive effects of *Nigella sativa* on the spontaneously hypertensive rat. *Therapie* (2000).
122. Hosseinzadeh, H., Eskandari, M. & Ziaee, T. Antitussive effect of thymoquinone, a constituent of *Nigella sativa* seeds, in guinea pigs. *Pharmacologyonline* (2008).
123. Woo, C. C., Kumar, A. P., Sethi, G. & Tan, K. H. B. Thymoquinone: Potential cure for inflammatory disorders and cancer. *Biochemical Pharmacology* (2012). doi:10.1016/j.bcp.2011.09.029
124. Kruk, I., Michalska, T., Lichszteld, K., Kladna, A. & Aboul-Enein, H. Y. The effect of thymol and its derivatives on reactions generating reactive oxygen species. *Chemosphere* (2000). doi:10.1016/S0045-6535(99)00454-3
125. Badary, O. A., Taha, R. A., Gamal El-Din, A. M. & Abdel-Wahab, M. H. Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug Chem. Toxicol.* **26**, 87–98 (2003).
126. Mohamed, A. *et al.* Improvement of Experimental Allergic Encephalomyelitis (EAE) by thymoquinone; an oxidative stress inhibitor. in *Biomedical Sciences Instrumentation* (2003).

127. Khalife, K. H. & Lupidi, G. Nonenzymatic reduction of thymoquinone in physiological conditions. *Free Radic. Res.* (2007). doi:10.1080/10715760600978815
128. Erboğa, M. *et al.* Protective effects of thymoquinone on experimental testicular ischaemia-reperfusion injury: An apoptotic, proliferative and biochemical study. *Andrologia* (2016). doi:10.1111/and.12436
129. Kapan, M. *et al.* Thymoquinone ameliorates bacterial translocation and inflammatory response in rats with intestinal obstruction. *Int. J. Surg.* (2012). doi:10.1016/j.ijssu.2012.06.006
130. Umar, S. *et al.* Modulation of the oxidative stress and inflammatory cytokine response by thymoquinone in the collagen induced arthritis in Wistar rats. *Chem. Biol. Interact.* (2012). doi:10.1016/j.cbi.2012.03.003
131. Houghton, P. J., Zarka, R., De Las Heras, B. & Hoult, J. R. S. Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Med.* (1995). doi:10.1055/s-2006-957994
132. Chehl, N., Chipitsyna, G., Gong, Q., Yeo, C. J. & Arafat, H. A. Anti-inflammatory effects of the *Nigella sativa* seed extract, thymoquinone, in pancreatic cancer cells. *HPB* (2009). doi:10.1111/j.1477-2574.2009.00059.x
133. Nagi, M. N. & Mansour, M. A. Protective effect of thymoquinone against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: A possible mechanism of protection. *Pharmacol. Res.* **41**, 283–289 (2000).
134. Badary, O. A., Al-Shabanah, O. A., Nagi, M. N., Al-Bekairi, A. M. & Elmazar, M. M. A. Acute and subchronic toxicity of thymoquinone in mice. *Drug Dev. Res.* (1998). doi:10.1002/(SICI)1098-2299(199806/07)44:2/3<56::AID-DDR2>3.0.CO;2-9
135. Al-Ali, A., Alkhawajah, A. A., Randhawa, M. A. & Shaikh, N. A. Oral and intraperitoneal LD50 of thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa*, in mice and rats. *J. Ayub Med. Coll. Abbottabad* (2008).
136. de Vries, R. B. M. *et al.* A protocol format for the preparation, registration and publication of systematic reviews of animal intervention studies. *Evidence-based Preclin. Med.* (2015). doi:10.1002/ebm2.7
137. Allen, M. J., Hankenson, K. D., Goodrich, L., Boivin, G. P. & von Rechenberg, B. Ethical use of animal models in musculoskeletal research. *J. Orthop. Res.* (2017). doi:10.1002/jor.23485
138. Dong, Y., Li, Y., Huang, C., Gao, K. & Weng, X. Systemic application of teriparatide for steroid induced osteonecrosis in a rat model. *BMC Musculoskelet. Disord.* **16**, 10–17 (2015).
139. Ma, H. Z., Zhou, D. S., Li, D., Zhang, W. & Zeng, B. F. A histomorphometric study of necrotic femoral head in rabbits treated with extracorporeal shock waves. *J. Phys. Ther. Sci.* **29**, 24–28 (2017).
140. Parkinson, I. H. & Fazzalari, N. L. Interrelationships between Structural Parameters of Cancellous Bone Reveal Accelerated Structural Change at Low Bone Volume. *J. Bone Miner. Res.* (2003). doi:10.1359/jbmr.2003.18.12.2200

141. Tombulturk, F. K. *et al.* Regulation of MMP 2 and MMP 9 expressions modulated by AP-1 (c-jun) in wound healing: improving role of *Lucilia sericata* in diabetic rats. *Acta Diabetol.* (2019). doi:10.1007/s00592-018-1237-5
142. Claßen, T. *et al.* Long-term clinical results after iloprost treatment for bone marrow edema and avascular necrosis. *Orthop. Rev. (Pavia).* (2016). doi:10.4081/or.2016.6150
143. Pritchett, J. W. Statin therapy decreases the risk of osteonecrosis in patients receiving steroids. *Clin. Orthop. Relat. Res.* (2001). doi:10.1097/00003086-200105000-00022
144. Glueck, C. J., Freiberg, R. A., Sieve, L. & Wang, P. Enoxaparin prevents progression of Stages I and II osteonecrosis of the hip. *Clin. Orthop. Relat. Res.* (2005). doi:10.1097/01.blo.0000157539.67567.03
145. Agarwala, S., Shah, S. & Joshi, V. R. The use of alendronate in the treatment of avascular necrosis of the femoral head: Follow-up to eight years. *J. Bone Jt. Surg. - Ser. B* (2009). doi:10.1302/0301-620X.91B8.21518
146. Barney, J., Piuze, N. S. & Akhondi, H. *Femoral Head Avascular Necrosis. StatPearls* (2019).
147. El Rabey, H. A., Al-Seen, M. N. & Bakhashwain, A. S. The antidiabetic activity of *Nigella sativa* and propolis on streptozotocin-induced diabetes and diabetic nephropathy in male rats. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* (2017). doi:10.1155/2017/5439645
148. Osman, M. T. *Nigella sativa* has beneficial effect on osteoporosis and bone healing: Is it a fact or fiction? a systematic review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* (2017). doi:10.22159/ajpcr.2017.v10i5.17437
149. Ahmad, A. *et al.* A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* (2013). doi:10.1016/S2221-1691(13)60075-1
150. Shady, A. M. & Nooh, H. Z. Effect of Black Seed (*Nigella Sativa*) on Compact Bone of Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Egypt. J. Histol.* (2010). doi:10.1097/00767537-201003000-00016
151. Kara, M. I. *et al.* Thymoquinone accelerates new bone formation in the rapid maxillary expansion procedure. *Arch. Oral Biol.* **57**, 357–363 (2012).
152. Arslan, A. H. *et al.* Histopathological evaluation of the effect of systemic thymoquinone administration on healing of bone defects in rat tibia. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* (2017). doi:10.1080/13102818.2016.1257925
153. Seif, A. A. *Nigella Sativa* reverses osteoporosis in ovariectomized rats. *BMC Complement. Altern. Med.* (2014). doi:10.1186/1472-6882-14-22
154. Al-Mutheffer, E. a. The Effect of Local Application Black Seed (*Nigella sativa*) Oil on Wound Healing In Rabbits. *Al- Anbar J. Vet. Sci.* (2010).
155. Narayanan, A. *et al.* Avascular Necrosis of Femoral Head: A Metabolomic, Biophysical, Biochemical, Electron Microscopic and Histopathological Characterization. *Sci. Rep.* **7**, 1–16 (2017).
156. Stoica, Z. *et al.* Imaging of avascular necrosis of femoral head: familiar methods and newer trends. *Curr. Heal. Sci. J.* (2009).

157. Jiang, Y. *et al.* Tetramethylpyrazine enhances vascularization and prevents osteonecrosis in steroid-treated rats. *Biomed Res. Int.* **2015**, (2015).
158. Li, S. & Wang, J. Salvianolic acid B prevents steroid-induced osteonecrosis of the femoral head via PPAR γ expression in rats. *Exp. Ther. Med.* (2017). doi:10.3892/etm.2016.4008
159. Zhou, L. *et al.* COMP-Angiopoietin1 potentiates the effects of bone morphogenic protein-2 on ischemic necrosis of the femoral head in rats. *PLoS One* (2014). doi:10.1371/journal.pone.0110593
160. Huang, Z. *et al.* Icariin Protects against Glucocorticoid-Induced Osteonecrosis of the Femoral Head in Rats. *Cell. Physiol. Biochem.* **47**, 694–706 (2018).
161. Zheng, L. Z. *et al.* Steroid-associated osteonecrosis animal model in rats. *J. Orthop. Transl.* **13**, 13–24 (2018).
162. Kerachian, M. A., Harvey, E. J., Cournoyer, D., Chow, T. Y. K. & Séguin, C. Avascular necrosis of the femoral head: Vascular hypotheses. *Endothel. J. Endothel. Cell Res.* **13**, 237–244 (2006).
163. Elliott, S. J., Meszaros, J. G. & Schilling, W. P. Effect of oxidant stress in calcium signaling in vascular endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* (1992). doi:10.1016/0891-5849(92)90038-I
164. Miyata, N. *et al.* Pentosan reduces osteonecrosis of femoral head in SHRSP. *Clin. Exp. Hypertens.* **32**, 511–516 (2010).
165. Mikami, T. *et al.* Prevention of steroid-induced osteonecrosis by intravenous administration of vitamin e in a rabbit model. *J. Orthop. Sci.* **15**, 674–677 (2010).
166. Ichiseki, T. *et al.* Oxidative stress by glutathione depletion induces osteonecrosis in rats. *Rheumatology* (2006). doi:10.1093/rheumatology/kei149
167. Nozaki, Y., Kumagai, K., Miyata, N. & Niwa, M. Pravastatin reduces steroid-induced osteonecrosis of the femoral head in SHRSP rats. *Acta Orthop.* **83**, 87–92 (2012).
168. Kömürçü, E. *et al.* Preventive effects of coenzyme Q10(CoQ10) on steroid-induced osteonecrosis in rats. *Acta Orthop. Traumatol. Turc.* **48**, 217–222 (2014).
169. Franco, R., Schoneveld, O. J., Pappa, A. & Panayiotidis, M. I. The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases. *Archives of Physiology and Biochemistry* (2007). doi:10.1080/13813450701661198
170. Mohammadi, S. *et al.* Protective effects of methylsulfonylmethane on hemodynamics and oxidative stress in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *Adv. Pharmacol. Sci.* (2012). doi:10.1155/2012/507278
171. Li, G. Y., Feng, Y., Cheng, T. S., Yin, J. M. & Zhang, C. Q. Edaravone, a novel free radical scavenger, prevents steroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Rheumatol. (United Kingdom)* **52**, 438–447 (2013).
172. Saracoglu, I. & Harput, U. S. In vitro cytotoxic activity and structure activity relationships of iridoid glucosides derived from veronica species. *Phyther. Res.* (2012). doi:10.1002/ptr.3546

173. Bitto, A. *et al.* Protective effect of genistein aglycone on the development of osteonecrosis of the femoral head and secondary osteoporosis induced by methylprednisolone in rats. *J. Endocrinol.* (2009). doi:10.1677/JOE-08-0552
174. Marini, H. *et al.* OPG and sRANKL serum concentrations in osteopenic, postmenopausal women after 2-year genistein administration. *J. Bone Miner. Res.* (2008). doi:10.1359/jbmr.080201
175. Yun, S. Il, Yoon, H. Y., Jeong, S. Y. & Chung, Y. S. Glucocorticoid induces apoptosis of osteoblast cells through the activation of glycogen synthase kinase 3 β . *J. Bone Miner. Metab.* (2009). doi:10.1007/s00774-008-0019-5
176. Bekler, H., Uygur, A. M., Gökçe, A. & Beyzadeoğlu, T. The effect of steroid use on the pathogenesis of avascular necrosis of the femoral head: an animal model. *Acta Orthop. Traumatol. Turc.* (2007).
177. Bejar, J., Peled, E. & Boss, J. H. Vasculature deprivation - Induced osteonecrosis of the rat femoral head as a model for therapeutic trials. *Theoretical Biology and Medical Modelling* (2005). doi:10.1186/1742-4682-2-24
178. Nakamura, T. *et al.* Pioglitazone exerts protective effects against stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, independently of blood pressure. *Stroke* (2007). doi:10.1161/STROKEAHA.107.486522
179. Yao, E. H. *et al.* Losartan improves the impaired function of endothelial progenitor cells in hypertension via an antioxidant effect. *Hypertens. Res.* (2007). doi:10.1291/hypres.30.1119
180. Weinstein, R. S. *et al.* Endogenous glucocorticoids decrease skeletal angiogenesis, vascularity, hydration, and strength in aged mice. *Aging Cell* (2010). doi:10.1111/j.1474-9726.2009.00545.x
181. Gerber, H. P. *et al.* VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat. Med.* (1999). doi:10.1038/9467
182. Arlet, J. Nontraumatic avascular necrosis of the femoral head: Past, present, and future. *Clinical Orthopaedics and Related Research* (1992). doi:10.1097/00003086-199204000-00003
183. Okpala, I. Leukocyte adhesion and the pathophysiology of sickle cell disease. *Current Opinion in Hematology* (2006). doi:10.1097/01.moh.0000190108.62414.06
184. Zeng, X. *et al.* The impact of high total cholesterol and high low-density lipoprotein on avascular necrosis of the femoral head in low-energy femoral neck fractures. *J. Orthop. Surg. Res.* (2017). doi:10.1186/s13018-017-0532-0
185. Xu, Z. *et al.* Higher Levels of Serum Triglycerides Were Associated with Postoperative Deep Vein Thrombosis after Total Hip Arthroplasty in Patients with Nontraumatic Osteonecrosis of the Femoral Head. *Int. J. Low. Extrem. Wounds* (2016). doi:10.1177/1534734615580017
186. Zhao, D. W. *et al.* Prevalence of nontraumatic osteonecrosis of the femoral head and its associated risk factors in the Chinese population: Results from a nationally representative survey. *Chin. Med. J. (Engl).* (2015). doi:10.4103/0366-6999.168017

187. Bian, Y. *et al.* Pathogenesis of glucocorticoid-induced avascular necrosis: A microarray analysis of gene expression in vitro. *Int. J. Mol. Med.* (2015). doi:10.3892/ijmm.2015.2273
188. Nagasawa, K. *et al.* Prevention of steroid-induced osteonecrosis of femoral head in systemic lupus erythematosus by anti-coagulant. *Lupus* (2006). doi:10.1191/0961203306lu2311oa
189. Miyanishi, K. *et al.* A high low-density lipoprotein cholesterol to high-density lipoprotein cholesterol ratio as a potential risk factor for corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Rheumatology* **40**, 196–201 (2001).
190. Li, Y., Han, R., Geng, C., Wang, Y. & Wei, L. A new osteonecrosis animal model of the femoral head induced by microwave heating and repaired with tissue engineered bone. *Int. Orthop.* (2009). doi:10.1007/s00264-008-0672-2
191. Suzuki, M. *et al.* Osteonecrosis of femoral head in the stroke-prone spontaneously hypertensive rats, especially old rats. *Clin. Exp. Hypertens.* (2008). doi:10.1080/10641960802251883



ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Mustafa Fatih DAŞCI

Doğum yeri ve tarihi: Anamur / 15.10.1990

Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti

Medeni durumu: Bekar

İletişim adresi ve telefonu: SBÜ İstanbul Bağcılar Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi, Merkez Mah. Dr. Sadık Ahmet Cad. No:6 34100 Bağcılar/İstanbul Tlf: +90 532 466 3633

E- mail: mfatihdasci@gmail.com

Yabancı dili: İngilizce

II- Eğitimi

2014 – Halen çalışmakta: Sağlık Bilimleri Üniversitesi İstanbul Bağcılar SUAM Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği

2007-2014: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi

2004-2007: TOBB Osmaniye Fen Lisesi

1996-2004: Mersin Tece İlköğretim Okulu

III- Ünvanları

2014 – Halen çalışmakta: Araştırma Görevlisi – Asistan Doktor (İstanbul, Türkiye)

2013-2014: İntörn Doktor (İzmir, Türkiye)

IV- Yurt dışı eğitimsel aktiviteler

University of Pittsburgh Orthopedic Surgery Department- Sports Medicine Clinic -

Prof. Dr. Freddie Fu - Clinical Fellowship (30 Ağustos -12 Ekim 2019)

V- Bilimsel İlgi Alanları

Sözlü Bildiriler:

1. Düşük molekül ağırlıklı heparin ile rivoroksaban kullanımının rat aşıl tendonunun iyileşmesi üzerine etkilerinin histopatolojik ve biyomekanik açıdan karşılaştırılması. Eren Y., Adanır O, Genç E., Atçı T., Özbay H., **Daşçı M.F.** 26. Ulusal Türk Ortopedi ve Travmatoloji Kongresi, 2016.

2. Titanyum elastik çivileme ile tedavi edilmiş pediatrik femur şaft kırıklarında vücut ağırlık persentili yüksek hastalardaki komplikasyon oranlarımız ve tedavi sonuçlarımız. **Daşcı M.F.**, Özbay H., Yüksel S., Atçı T. İstanbul Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ortopedi ve Travmatoloji Buluşması, 2017.

3. Povidon iyodür, hidrojen peroksit ve klorheksidinin sıçan femuru kırık modelinde kemik iyileşmesine etkileri Özbay H., Yüksel S, **Daşcı MF**, Güleç MA. 30. Ulusal Türk Ortopedi ve Travmatoloji Kongresi, 2020.

Poster Bildirileri :

1 Fibula başı avulsiyon kırığı ve eşlik eden peroneal sinir yaralanması: Nadir bir olgu sunumu. Tolgahan Atcı, **M Fatih Daşcı**, Hakan Özbay, Ender Alagöz. 2016, 13. Türkiye Spor Yaralanmaları ve Artroskopik Derneği Kongresi – İstanbul.

2 Proksimal interfalangeal eklemin irredüktabl açık plantare çıkığı ve eş zamanlı komşu parmak proksimal interfalangeal ekleminde görülen kapalı plantare çıkık: Nadir bir ayak travması olgu sunumu. **M Fatih Daşcı**, Tolgahan Atcı, Hakan Özbay, Ender Alagöz

3 Proksimal Humerus Anterior Kırıklı Çıkık Nedeniyle Açık Redüksiyon Internal Fiksasyon Uygulanan Hastalarda Radyolojik ve Fonksiyonel Sonuçlarımız. Hakan Özbay¹, Serdar Yüksel¹, Tolgahan Atçı¹, **Mustafa Fatih Daşcı¹**. 2017, University of Health Science Orthopedics and Traumatology Meeting

4 Lateral malleol epiphyseal fracture by posterior inferior tibiofibular and inferior transverse ligament avulsion fracture: A rare case report. Hakan Özbay, Sever Çağlar, Serdar Yüksel, Tolgahan Atcı, **M Fatih Daşcı**, Abdurrahman Acar. Osteosynthese International, 2017

VI- Bilimsel Etkinlikleri

Katıldığı Kurslar:

1.AO Travma kırık tedavisinin temel prensipleri, Ocak 2018, Ankara, Türkiye

2.Intercontinental 3D Surgery Course, 2017, İstanbul, Türkiye

3.Temel Bilimler Araştırma Okulu, 2017, Sivas, Türkiye

4. Ege diz cerrahisi ve artroskopi günleri kadavra kursu, Şubat 2016, İzmir, Türkiye.

5. Diz ve omuz temel artroskopi kursu, 2016, İstanbul, Türkiye.