



T.C.

SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ,

BAKIRKÖY DR. SADİ KONUK

SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ

ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

**MASQUELET TEKNİĞİNDE KULLANILAN SEMENT
İÇERİĞİNİN MODİFİYE EDİLEREK GELİŞTİRİLMESİ**

DR. NEZİH ZİROĞLU

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. MUSTAFA GÖKHAN BİLGİLİ

İSTANBUL

2019





T.C.

SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ,

BAKIRKÖY DR. SADİ KONUK

SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ

ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

**MASQUELET TEKNİĞİNDE KULLANILAN SEMENT
İÇERİĞİNİN MODİFİYE EDİLEREK GELİŞTİRİLMESİ**

DR. NEZİH ZİROĞLU

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. MUSTAFA GÖKHAN BİLGİLİ

İSTANBUL

2019



İTİP Sağlık Kurumu

**İSTANBUL MEHMET AKİF ERSOY
DENEYSEL ARAŞTIRMA GELİŞTİRME VE EĞİTİM MERKEZİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
KARAR METNİ**

SAYI: 2018/06

23.03.2018

KONU: Doç Dr Mustafa Gökhan Bilgili
Proje Başvuru Kararı

Sayın Doç Dr Mustafa Gökhan Bilgili;

“Masquelet tekniğinde kullanılan çimento özelliklerinin geliştirilmesi” başlıklı projeniz 23.03.2018 tarihinde yapılan Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş ve uygun bulunarak onanmıştır.

Hayvan Türü :Sıçan
Hayvan Sayısı :49
Geçerlilik Süresi: 03/2018-03/2020

Prof. Dr. Abdurrahman EKŞİK

Üye

Uzm. Dr. İlknur ERKÖSEOĞLU

Üye

Gülşen TEMİZ

Üye

Opr. Dr. Ersin KADİROĞULLARI

Üye

Uzm. Vet. Hek. Öznuş İNAN

Üye

Yalçın Kaya BOBER

Üye

Doç. Dr. Burak QNAN
Etik Kurul Başkanı

Adres : İstasyon Mah. Turgut Özal Bulv. No:13/1
Küçükçekmece /İstanbul
Telefon : 0212 472 80 00
e-posta : ideahadyek@gmail.com



İTİP Sağlık Kurumu
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Başkanlık ve Kurul Üyeleri
İmza ve Mühür Alanı



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlamasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Dr. Nezih Ziroğlu



TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim boyunca üzerimizde çok emeği olan, sadece eğitici ve klinisyen olarak değil insan olarak da örnek bir kişi olan, bundan sonra da bilgi ve tecrübelerinden her zaman faydalanacağım saygıdeğer klinik şefimiz **Prof. Dr. Cemal Kural**'a teşekkürlerimi sunarım.

Klinikteki ilk günümüzde, burasının ikinci bir baba ocağı olacağını söyleyen ve bir aile aidiyeti içinde olmamızı sağlayan eski klinik şefimiz sayın **Doç. Dr. Mustafa Cevdet Avkan**'a,

Tez konumu belirlediğimiz ilk andan, yazımın tamamlanmasına kadar her anda yardımını hissettiğim ve fikirlerime hep saygı duyan tez danışmanım **Doç. Dr. Mustafa Gökhan Bilgili**'ye,

Hem cerrahi hem de teorik eğitimimizde büyük katkıları olan **Doç. Dr. Serdar Hakan Başaran** ve **Doç. Dr. Ersin Erçin**'e,

Bizden yardımlarını esirgemeyen başasistanımız **Dr. Erdem Edipoğlu**'na,

Kliniğimiz uzman ağabeylerimizden **Dr. Halil Nadir Öneş**, **Dr. Mustafa Güroğlu**, **Dr. Bülent Tanrıverdi**, **Dr. Emre Baca**, **Dr. Süleyman Altun**, , **Dr. Önder Murat Hürmeş** ve özellikle beni akademik dünya ile tanıştıran sevgili ağabeyim **Dr. Altuğ Duramaz**'a,

Tezimin hipstopatoloji ve biyokimyasal değerlendirilmesi aşamasından içtenliği ile yardımını hissettiğim **Doç. Dr. Gamze Tanrıverdi**'ye,

Aylar süre laboratuvar günlerinde bana her türlü desteği veren, kardeşim gibi gördüğüm **Dr. Alican Koluman**'a,

İhtisasım boyunca bana kattıkları için kıdemli ağabeylerim **Dr. Cihangir Sarı**, **Dr. Alkan Bayrak**, **Dr. Mehmet Erkınlıç**, **Dr. Hüseyin Çümen**, **Dr. Kurmay Mümtaz Çelen**, **Dr. Kadir Gözügöl**, **Ahmet Büyükhatoğlu**, **Dr. Furkan Çağlayan Aslantaş**, **Dr. Mustafa Yalın**, **Dr. Berhan Bayram** ve **Dr. Cemal Kızılkaya**'ya,

Berber çalışma fırsatı bulduğum kardeşlerim, **Dr. Malik Çelik**, **Dr. Hakan İlter**, **Dr. Vedat Öztürk**, **Dr. Ergin Tüy**, **Dr. Özgür İsmail Türk**, **Dr. Necati Doğan**, **Dr. Burak Belen**, **Dr. Başar Burak Çakmur**, **Dr. Ahmet Çanlıoğlu**, **Dr. Ahmet Yiğitbay**, **Dr. Tevfik Çatal**, **Dr. Mehmet Utku Çiftçi**, **Dr. Miraçhan Kantarcı**, **Dr. Muhammed Can Arı**, **Dr. Murat Tıngır** ve **Dr. Nebi Köksal Yazgan**'a,

Sorumlu Hemşirelerimiz **Ayten Seller**, **Münevver Özdemir** ve **Nurten Yıkılmaz** nezdinde tüm servis hemşirelerimiz, ayrıca yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen tamamının isimlerini yazamadığım ameliyathane hemşirelerimiz adına benim için birer abla olan **Şenay Aksu** ve **Semra Tetik Gümüşsoy**'a,

İhtisasım boyunca özellikle acil ortopedi polikliniğinde gece gündüz demeden kader ortaklığı yaptığımız çalışma arkadaşlarım, **Songül Şen, Hanifi Acar, İsmail Nalbant, Serdar Kurban, H. İbrahim Üzümlü, Fidan Demircan, Hamide Başak Şahin, Nur Muhammet Tunç, Kübra Ünal, Ali Pekaslı, Hasan Aygün, Recep Gülmez, Elif Bay, Gökçe Yılmaz, Zeliha Özdemir ve Başak Oral'a.**

Yazarken sona sakladığım ama benim için her zaman öncelik olan, her şeyimi borçlu olduğum, hayattaki şanslarım annem **S. Senem Ziroğlu**, babam **Mehmet Ziroğlu**, kardeşim ve yoldaşım **Başar Ziroğlu'na**,
Her daim yüzümü güldüren **Gülşah'a**,

Adı burada geçmeyip, üzerimde emeği olan öğretmenlerime, arkadaşlarıma; hayatıma anlam katan ve bir şekilde hayatıma dokunmuş olan herkese sonsuz teşekkürler...

Dr. Nezih Ziroğlu

Nisan 2019

İstanbul

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
KISALTMALAR.....	viii
TABLO LİSTESİ.....	ix
GÖRSELLER LİSTESİ.....	x
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiv
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1 Kemik Gelişimi (Osteogenezis)	2
2.1.1 İntramembranöz kemikleşme	2
2.1.2 Endokondral kemikleşme	3
2.2 Kritik Boyut Kemik Defekti.....	5
2.3 Kaynamama Ve Psödoartroz Tanımı Ve Tipleri.....	7
2.3.1 Nonunion (psödoartroz).....	7
2.4 Kaynamama Ve Psödoartroz Tedavi Seçenekleri	10
2.4.1 Cerrahi Dışı Tedavi	10
2.4.2 Cerrahi Tedavi	11
2.4.3 Kaynamama Tamirine Ekler.....	15
2.5 Masquelet Tekniği.....	17
2.5.1 Masquelet Tekniği İle Kemik Defektlerinin Tedavisi.....	18
2.5.2 Tekniğin prensipleri.....	18
2.5.3 Yabancı Cisim Reaksiyonu ile İndüklenmiş Membran Oluşması.....	19
2.5.4 Oluşan Membranın Histolojisi.....	20
2.6. Antibiyotikler	21
2.6.1 Fusidik Asit.....	21
2.6.2 Gentamisin.....	22

2.6.3 Teikoplanin.....	23
2.7 Östrojenin Kemik Üzerindeki Etkisi	24
2.7.1 Östrojen	24
2.7.2. Östrojen Reseptörleri.....	25
2.7.3. Östrojenin Kök Hücreler Üzerindeki Etkisi	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1. Deney Hayvanları Ve Çalışma Grupları	27
3.2. Hazırlık Ve Ameliyat	28
3.3. Modifiye Edilen Kemik Çimentonun Hazırlanışı Ve Uygulanması	30
3.4. Deney Hayvanlarının Sakrifiye Edilmesi.....	33
3.5. Radyolojik inceleme.....	34
3.6. Histopatolojik Değerlendirme	35
3.6.1 İmmünohistokimyasal İnceleme:.....	35
3.6.2 Boyamanın Özgünlüğü:.....	35
3.7. İstatiksel Yöntem Ve Güç Analizi	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. Histopatolojik Değerlendirme	37
4.2. İmmünohistokimyasal Değerlendirme	42
4.2.1 VEGF Ekspresyonu ile Değerlendirme	42
4.2.2 TGF-b Ekspresyonu ile Değerlendirme.....	44
4.3 Histolojik Verilerin İstatistiksel Çözümlemesi	48
5. TARTIŞMA	51
6. SONUÇLAR.....	60
7. KAYNAK LİSTESİ.....	61

KISALTMALAR

PMMA: Polimetil metakrilat

İM: İndüklenmiş membran

FDA: Food and drug administration

FA: Fusidik asit

T: Teikoplanin

G: Gentamisin

BC: Bone chips (otojen greft grubu)

K: Kontrol

E: Östrojen

KBD: Kritik boyutta defekt

MRSA: Metisilin rezistans staf. aureus

GER: Granüllü endoplazmik retinakulum

ER: Östrojen reseptörü

Kİ: Kemik iliği

MSC: Mesenchimal stem cell

VEGF: Vascular endotelial growth factor

TGF-Beta: Tumor growth factor - beta

PBS: Phosphate buffered saline

BMP-2: Bone morphogenic protein 2

CBFA1: Core-binding factor alpha 1

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Çalışma grupları, hayvan sayıları ve sakrifikasyon tarihleri	sayfa 28
Tablo 2: Goldberg direkt radyografik görüntüleme sınıflama sistemi	sayfa 33
Tablo 3: Huo ve arkadaşlarının histopatolojik sınıflama sistemi	sayfa 41
Tablo 4: Tüm ratların, histopatolojik sınıflama skorlarını gösteren tablo	sayfa 41
Tablo 5: İmmunoreaktif skrolama sistemi (IRS)	sayfa 42
Tablo 6: Tüm ratların, VEGF ekspresyonularını gösteren tablo	sayfa 42
Tablo 7: Deney gruplarına ait VEGF ve TGF-b ekspresyon seviyeleri	sayfa 42
Tablo 8: Tüm ratların, TGF-b ekspresyonularını gösteren tablo	sayfa 44
Tablo 9: Gruplara Göre Düzeylerin Karşılaştırılması- Kruskall Wallis H testi	sayfa 48
Tablo 10: İkili karşılaştırmalar- Bonferroni Dunn Çoklu karşılaştırma testi	sayfa 50

GÖRSELLER LİSTESİ

Görsel 1: İntramembranöz kemikleşme	sayfa 3
Görsel 2: Endokondral kemikleşme	sayfa 5
Görsel 3: Kritik boy kemik defekti	sayfa 6
Görsel 4: Hipervasküler (hipertrofik) kaynamamış kırıklar	sayfa 8
Görsel 5: Avasküler (atrofik) kaynamamış kırıklar	sayfa 10
Görsel 6: Vaskülerize fibula grefti	sayfa 16
Görsel 7: Masquelet tekniğinin uygulama basamakları	sayfa 18
Görsel 8: Rat femurunda kemik çimento üzerinde oluşan İM	sayfa 20
Görsel 9: 17 β -östradiolün kimyasal yapısı	sayfa 24
Görsel 10: Ameliyat masası görünümü	sayfa 28
Görsel 11: Operasyona ait basamakların sıralı görünümü	sayfa 29
Görsel 12: Steril kap içerisinde kemik çimento hazırlanışı	sayfa 31
Görsel 13: Fusidik asit katkılı sementin, defekt bölgesine uygulanışı	sayfa 32
Görsel 14: Östrojen grubuna ait rat, 4. hafta sonucu oluşan İM görüntüsü	sayfa 33
Görsel 15: Görüntülemelerin yapıldığı cihaz	sayfa 34
Görsel 16: K Grubu - Saf PMMA içeren grup	sayfa 37
Görsel 17: G Grubu - PMMA+Gentamisin içeren grubu	sayfa 38
Görsel 18: F Grubu - PMMA+Fusidik asit içeren grup	sayfa 38
Görsel 19: T Grubu - PMMA+Teikoplanin içeren grup	sayfa 39
Görsel 20: BC Grubu - PMMA+Bone Chips içeren grup	sayfa 39
Görsel 21-22: E Grubu - PMMA + Östrojen içeren grup	sayfa 40

Görsel 23: (A) saf PMMA ve (B) PMMA + gentamisin, VEGF ekspresyonu	sayfa 43
Görsel 24: (C) PMMA – fusidik asit ve (D) PMMA – teikoplanin, VEGF ekspresyonu	sayfa 43
Görsel 25: (E) PMMA – östrojen ve (F) PMMA – otojen greft, VEGF ekspresyonu	sayfa 44
Görsel 26: (A ve B) Saf PMMA içeren grupta; TGF-B ekspresyon seviyeleri,	sayfa 45
Görsel 27: (C ve D) PMMA+Gentamisin grubunda; TGF-B ekspresyon seviyeleri	sayfa 45
Görsel 28: (E ve F) PMMA+Fusidik asit grubunda; TGF-B ekspresyon seviyeleri	sayfa 46
Görsel 29: (G ve H) PMMA+Teikoplanin grubunda; TGF-B ekspresyon seviyeleri	sayfa 46
Görsel 30: (I ve J) PMMA+Östrojen grubunda; TGF-B ekspresyon seviyeleri	sayfa 47
Görsel 31: (K ve L) PMMA+Bone Chips grubunda; TGF-B ekspresyon seviyeleri	sayfa 47

MASQUELET TEKNİĞİNDE KULLANILAN SEMENT İÇERİĞİNİN, MODİFİYE EDİLEREK GELİŞTİRİLMESİ

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı iki aşamalı bir cerrahi prosedür olarak tanımlanan Masquelet tekniğinin ilk aşamasında kullanılan kemik çimentonun (sement – PMAA) modifiye edilerek, daha kaliteli bir İM oluşturulması ve tekniğin geliştirilmesidir.

Materyal ve metot: Kırk iki adet Wistar Hannover cinsi erkek rat 6 gruba ayrıldı. Ratların ortalama ağırlıkları 300-350 gram, ortalama yaşları 10-12 aydı. Gruplar K (kontrol), G (gentamisin), T (teikoplanin), F (fusidik asit), E (östrojen) ve BC (otojen greft) harfleri ile isimlendirildiler.

Anestezi işlemini takiben her hayvana standart olarak uygun tıraşın ardından, steril boyama ve örtme uygulandı. Keskin insizyon sonrasında yumuşak dokular künt olarak geçildi. Femur diyafizine, 6 delikli plak 2 adet proksimale ve 2 adet de distal olmak üzere 4 adet kilitli vida ile tespit edildi ve ortadaki 2 delik kılavuz olarak kullanılarak, ince Kirschner teli ile osteotomize edildi. Oluşturulan defekt için kullanılacak olan çimento miktarı 2 delik arasındaki sabit mesafe ve elektronik tartı ile standardize edildi. İşlem sonrasında her hayvana 2 adet direkt radyografik görüntüleme yapıldı.

İki aşamalı bir teknik olarak tanımlanan işlemin ilk aşamasında, PMMA hazırlanması esnasında K grubuna yalın PMMA, G grubuna gentamisin katkılı PMMA, T grubuna teikoplanin katkılı PMMA, F grubuna fusidik asit katkılı PMMA, E grubuna östrojen katkılı PMMA ve BC grubuna ise osteotomize edilen femur diyafiz parçalanarak otojen greftli PMMA grupları oluşturuldu.

Ameliyat sonrası 4. haftada yapılan ikincil bir operasyon ile alınan İM örnekleri %10'luk formol ise steril patoloji kaplarına konarak laboratuara gönderildi ve yüksek doz anestetik uygulaması ile hayvanlar sakrifiye edildi. Sakrifikasyon öncesi biyokimyasal çalışmalar için intrakardiak kan örnekleri alındı ve radyografileri çekildi.

Bulgular: Histolojik ve immunhistokimyasal değerlendirmeler sonucunda, tüm alt gruplarda kemik yapım bulguları olmakla birlikte E grubunda yoğun membranöz kemikleşme ile birlikte iyi organize olmuş kemik ve kemik iliği adacıkları saptandı. Bu da hem oluşan kemik kalitesi hem de oluşma hızının E – östrojen grubunda daha iyi olduğu şeklinde yorumlandı. Östrojen grubu, TGF-b ve VEGF ekspresyon oralarında da en kuvvetli olarak saptandı,

Östrojen grubunu orta düzeyde ekspresyon gösteren G,F,T grupları takip etti. K ve BC grupları ise zayıf ekspresyon gösterdiler.

Sonuç: İM tekniğinde, çimento içerisine konulan uygun dozlarda antibiyotikler ile İM kalitesi artırılırken, enfeksiyon komplikasyonlarının da önüne geçilebilir. Bunun yanında biyolojik ya da kimyasal zenginleştirici ajanlarla, daha kaliteli membran üretimi mümkündür.

Anahtar Kelimeler: masquelet tekniği, indüklenmiş membran, femur kaynamama, yabancı cisim reaksiyonu, PMMA, fusidik asit, teikoplanin, gentamisin, östrojen, kemik defekti



IMPROVING CEMENT CONTENT BY MODIFYING INGREDIENTS IN MASQUELET TECHNIQUE

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to modify the bone cement (cement - PMAA) used in the first stage of the Masquelet technique, which was defined as a two-stage surgical procedure, to create a better quality IM and to improve the technique.

Material and Method: A total of 42 Wistar Hannover species, mean weight 300-350g, mean age 10-12 months, each consisting of 6 subgroups, control group and five subgroups were included in the study. As mentioned above, groups were 7 to be controlled. K (control), G (gentamicin), T (teicoplanin), F (fusidic acid), E (estrogen) and BC (autogenous graft) were named with the letters.

Following anesthesia, sterile staining and covering were applied to each animal as a standard after appropriate shaving. After sharp incision, soft tissues were passed bluntly. Femoral diaphyseal, 6-hole plate 2 proximal and 2 distal holes were fixed with 4 locking screws and 2 holes in the middle were osteotomized with a thin Kirschner wire. In this way, the rigid fixation was achieved, the fixed distance between the 2 holes and the amount of PMMA to be applied were standardized. After procedure, 2 plane x ray imaging were applied for each animal.

In the first stage of the procedure defined as a two-stage technique, the PM group in the PMMA preparation, the PMMA in the G group, the PMMA in the group G, the PMMA in the T group, the PMMA in the F group, the PMMA in the F group, the PMMA in the group E, the PMMA in the estradiol group, the osteotomized osteotomized group in the BC group PMMA groups were applied.

IM samples taken with a secondary operation performed at the 4th week postoperatively were put into sterile pathology containers and 10% formol was sent to the laboratory and animals were sacrificed with high dose anesthetic. Before the evaluation, intracardiac blood samples were taken for biochemical studies and radiographs were taken.

Results: As a result of histological and immunohistochemical evaluations, there were bone-making findings in all subgroups, but in the group E, intense membranous ossification and well organized bone and bone marrow islets were also found. These findings were interpreted

as better bone quality and rate of formation in group E. In the estrogen group, TGF- β and VEGF expression was the most potent, it's followed by G, F and T groups that showed moderate expression. K and BC groups showed poor expression.

Conclusion: In the IM technique, it is possible to produce better quality membranes with the biological or chemical enriching agents put into the cement. Adding antibiotic into the bone cement can reduce infection rates, while improving IM quality.

Key words: masquetelet technique, induced membrane, femur non union, foreign body reaction, PMMA, fucidic acid, teicoplanin, gentamisin, estrogen, bone defect



1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kemik kaybının etiyojisine bakılmaksızın, uzun kemiklerin büyük diyafiz defektlerinin rekonstrüksiyonu, ekstremitte kurtarma için en büyük zorluklardan biridir. . Küçük defektler nonvaskülerize kansellöz kemik greftiyle tedavi edilirken, 5 cm den büyük defektlerde otolog kemik greftin rezorbsiyon riskinden dolayı tek başına tavsiye edilmemektedir. Bu sorunun çözümünde günümüzde kabul görmüş, en bilinen ve yaygın olarak kullanılan prosedürler; vaskülerize kemik transferi, Ilizarov-distraksiyon tekniği ile osteogenezis ve indükte membran (İM) tekniğidir.

Masquelet, büyük defektlerdeki bu problem için yeni bir teknik tanımlamıştır (1-2). Bu iki aşamalı tekniğin ilk aşamasında, kemik defekti mekanik bir işlevine sahip olan ve fibroz doku defekti içine girmesini önleyen polimetilmetakrilat (PMMA) kemik çimentosu ile doldurulur. Çimentoda yabancı cisim reaksiyonu ile bir membran oluşur. Bu membran kemik greftini revaskülerize eder ve greftin rezorpsiyonunu önleyerek biyolojik etkinlik gösterir. İkinci aşamada 6-8 hafta sonra, çimento hasar görmeden yeni bir cerrahi prosedürle çıkarılır ve defekt, kansellöz kemik grefti ile doldurulur. Membran, grefti emilimden koruyarak kemik iyileşmesini sağlar (3-4).

Güncel ortopedi pratiğinin de en dikkat çekici uygulamalarından birini oluşturmaya başlayan Masquelet tekniği, üzerinde birçok araştırmacının yoğunlaştığı bir konu haline gelmiştir. Araştırmalar temel olarak birkaç ana başlık altında toplanmaktadır. Kısaca şu şekilde ifade edilebilir. Oluşturulan İM kalitesini artırmak ve/veya oluşma süresini kısaltmak, ameliyat sonrası refraktür, deformite oluşumu ve enfeksiyon gibi komplikasyon oranlarını azaltmaktır.

Çalışmamızın amacı, İM kalitesini artırıp, oluşma süresini kısaltmaya yönelik idi. Bu amaçla çimento içerisine anabolik etkisi olan östrojen, büyüme faktörleri açısından zengin içeriğe sahip otogreft ekleyerek daha kaliteli İM oluşturmaktır. Bunun yanında kollajen doku oluşumuna olumsuz etkileri olduğu düşünülen termostabil antibiyotiklerin etkileri de araştırıldı.

Literatürde kemik çimentosuna östrojen eklenerek oluşturulan İM kalitesini değerlendiren bir çalışma bulamadık. Osteotomize edilen kemiğin kemik çimentoya eklenmesiyle oluşturulan grup da özgündür. Bu gerekçelerle E ve BC grupları oluşturuldu. Bunun yanın rutinde kullanıma giren gentamisinli PMMA zaman zaman tercih edilen

teikoplanin ile yapılmış daha az miktarda çalışma olsa da, fusidik asit ile yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Kemik afinitesi yüksek ve Staf. Aureus gibi ortopedik pratikte en sık görülen enfeksiyonlara karşı etkiliği yüksek T,F ve G grupları oluşturuldu.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 KEMİK GELİŞİMİ (OSTEOGENEZİS)

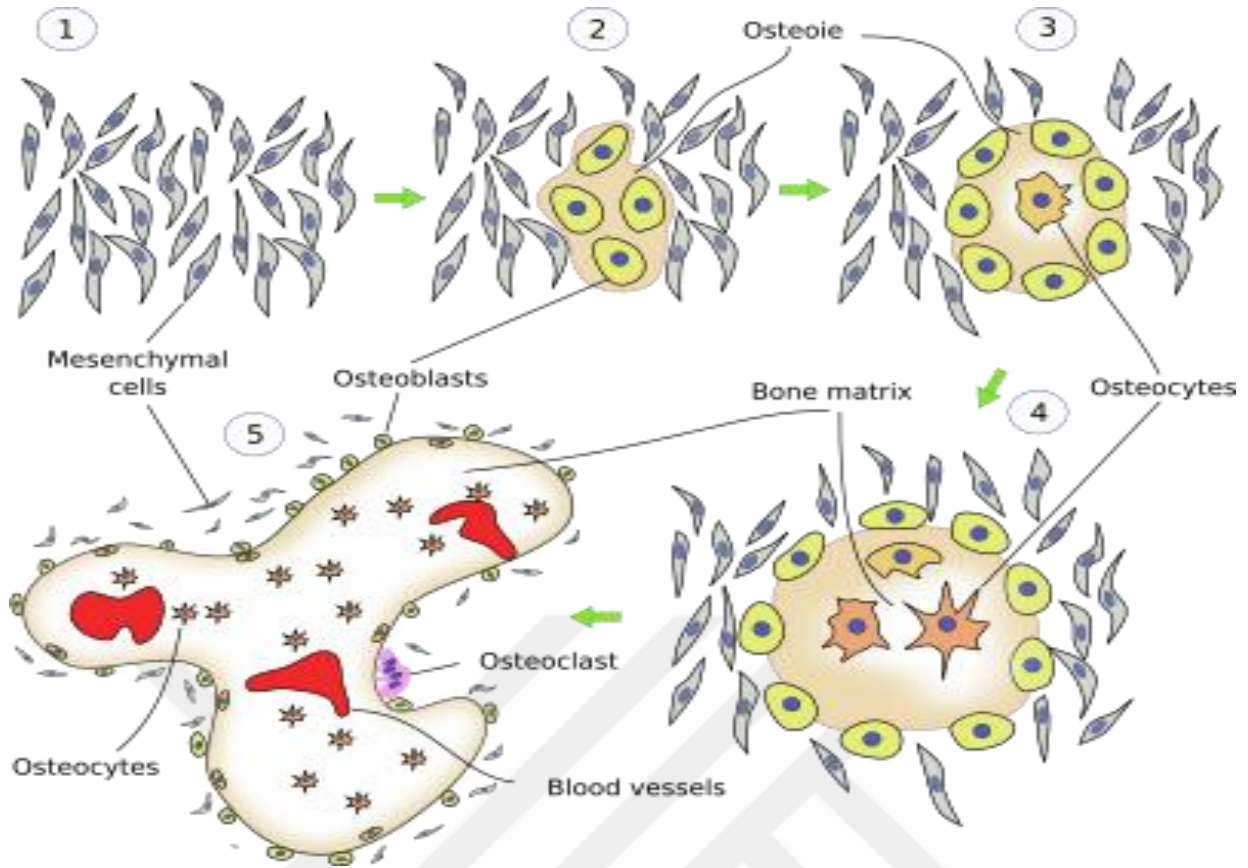
Kemik gelişimi ya da osteogenez iki sürecin biri tarafından meydana gelir.

2.1.1 İNTRAMEMBRANÖZ KEMİKLEŞME

Farklılaşmamış mezenkimal hücreler tabakalar halinde birleşirler, osteoblastlara dönüşürler ve organik matriks oluşturarak mineralize olurlar. Kıkırdak bir model yoktur (Görsel 1).

İntramembranöz kemikleşmeye; embriyonik yassı kemik oluşumu, stabil distraksiyon osteogenezisinde oluşan kemik (instabil ise encondral kemikleşme olur), çocuk uzun kemik seviyesinden yapılan amputasyon sonrası oluşan blastema kemik örnek olarak verilebilir.

Mezenkimal doku yoğunlaşmasının içinde ossifikasyonun başladığı ilk noktaya primer kemikleşme merkezi denir. Bu yolla kemik oluşacak alanlardaki mezenkim hücreleri uzantılarını çekip hızlı bir bölünme göstererek osteoprogenitör hücre olurlar. Daha sonra bunlar osteoblastlara dönüşerek kemik matriksinin kollajen liflerini ve şekilsiz temel maddesini sentezler. Osteoblastlar, salgıladıkları matriks içinde gömülü kalırlar. Mezenkim dokusu içinde osteoid odakları meydana gelir. Osteoid odaklarının arasında kalan mezenkim dokusunun içine kapiller damarlar filizlenir. Bu damarlardan çıkıp osteoid dokuya giren kalsiyum ve fosfor iyonları, buradaki osteoblastların salgıladığı alkalen fosfataz enziminin aracılığı ile kalsiyum fosfat molekülleri şeklinde matrikse çöker. Böylece osteoid kireçleşerek primer kemik dokusu halini alır, osteoblastlar da primer kemik dokusu içindeki kendilerine ait lakünalar içinde osteositlere dönüşür. Bu şekilde meydana gelen değişik şekil ve büyüklükteki kemik parçacıklarına kemik trabekülleri veya kemik spikülleri denir. Trabeküllerin yüzeyinde, osteoprogenitör hücrelerden türeyen osteoblastlar tek sıra halinde dizilerek lamelli kemik yapmaya başlarlar. Böylece trabeküller büyüyüp uzarlar. Birkaç odakta birbirinden ayrı oluşan kemik trabekülleri bu şekilde uzayıp birbirleriyle birleşerek süngerimsi yapıyı meydana getirir (5,6) .



Görsel 1: İntramembranöz kemikleşme

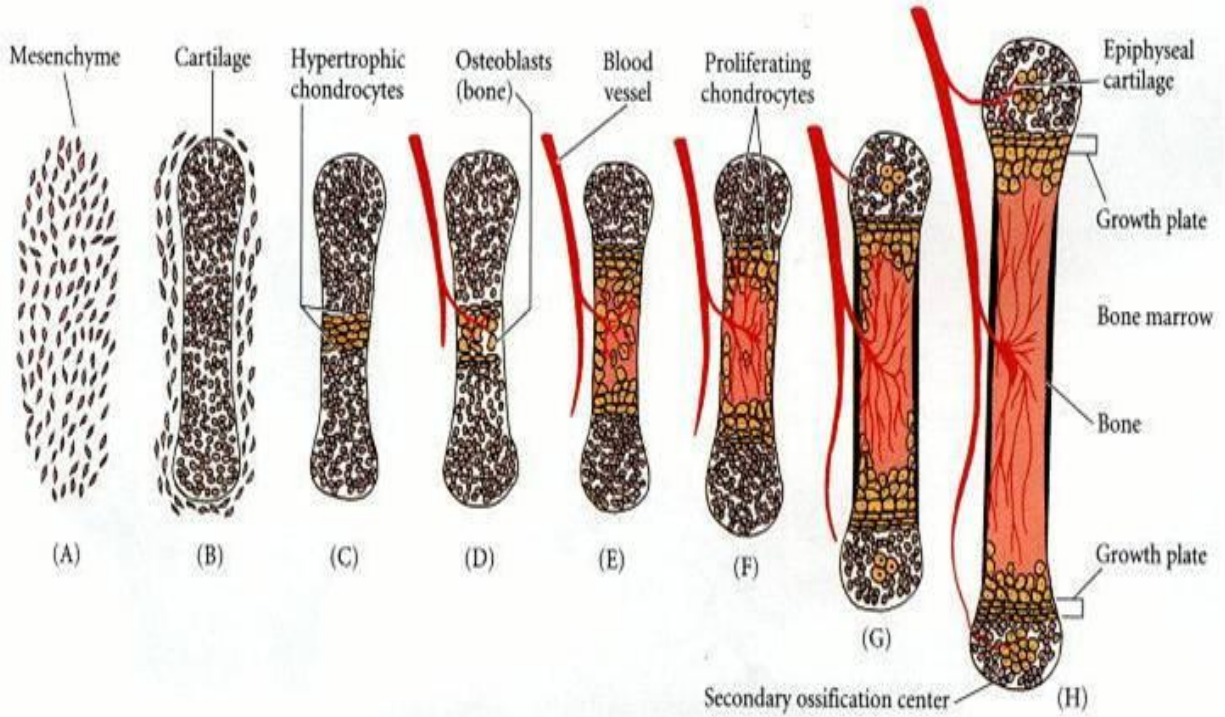
2.1.2 ENDOKONDRAL KEMİKLEŞME

Uzun ve kısa kemikler bu yolla meydana gelir. Bu kemiklerin gelişecekleri yerde önce hyalin kıkırdaktan ufak birer modelleri şekillenir. Endokondral kemikleşmeyle, bu kıkırdak modelin yerini kemik dokusu alır (Görsel 2).

Kıkırdak modelin diyafiz bölgesinde, kıkırdaki örten perikondriumun iç katındaki mezenkim hücreleri bölünerek osteoprogenitör hücrelere, onlar da osteoblastlara farklılaşırlar. Osteoblastlar burada kemik matriksi sentezleyip etraflarına salgırlar ve kendileri de matriks içinde gömülü kalıp osteositlere dönüşürler. Böylece kıkırdak modelin diyafizinde, intramembranöz kemikleşme ile silindir biçiminde bir kemik manşet oluşur. Kemik manşeti saran zar da artık, periosteum olarak adlandırılır. Normalde kıkırdak matriksi kan damarı içermediği için kıkırdak hücreleri, perikondriumdaki kan damarlarından çıkan besin maddelerinin difüzyonuyla beslenir. Ancak kemik manşet şekillenince difüzyon engellenir. Bu durum, kemik manşetin çevrelediği alandaki kıkırdak hücrelerinin beslenemeyip bozulmalarına yol açar. Bozulmaya yüz tutan hücreler önce irileşir (hipertrofi), peşinden de dejenere olmaya başlar. Hücreler dejenere olup yıkıldıktan sonra geriye sadece

hücreler arasındaki kıkırdak matriksi (kıkırdak spikülleri) kalır. Bu sırada periosteumda osteoklastlar belirir ve bunlar kemik manşeti yer yer delerek foramen nutrisyumları açarlar. Periosteumdaki kan damarlarının bir kısmı bu deliklerden girip, kıkırdak spiküllerinin arasında kalan boşluklara filizlenir. Bu damarlardan çıkan kalsiyum ve fosfor iyonları, kondrositlerden açığa çıkan alkalen fosfataz enziminin aracılığı ile birleşerek kıkırdak spiküllerini oluşturan matrikse çöker ve onu kireçlendirir. Yani matriks kalsifiye olup sertleşir. Spiküller arasındaki kondrositlerin dejenere olup ölmesiyle ortaya çıkan boşluklara, kan damarlarıyla birlikte mezenkim hücreleri de girer. Bu hücrelerden farklılaşan osteoblastlar, kalsifiye olmuş kıkırdak spiküllerinin üzerine tek sıra halinde dizilerek primer kemik dokusu yapmaya başlar. Histolojik kesitlerde, kalsifiye olmuş kıkırdak matriksi bazofilik boyanmış, bunun üzerinde oluşan kemik dokusu da asidofilik olarak izlenir. Kemik trabekülleri büyüdükçe, kalsifiye kıkırdak matriksi de osteoklastlara benzeyen çok çekirdekli dev hücreler tarafından ortadan kaldırılır Trabeküller arasındaki boşluklarda da, mezenkim hücrelerinden köken alan kırmızı kemik iliği gelişir (6,7).

Primer kemikleşme merkezinin büyümesi, periostal kemik manşetin epifizlere doğru büyüyüp ilerlemesi sonucunda aynı olayların tekrar etmesiyle gerçekleşir. Bu sırada osteoklastlar aktif haldedir ve kemikleşmenin başlangıcından itibaren kemik spiküllerini merkezden başlayarak rezorbe ederler, böylece kemik iliği boşluğunu meydana getirirler. Bu boşluk, kıkırdak modelin kemikleşmesi ve uzaması tamamlanıncaya kadar epifizlere doğru büyür. Dejenere olarak ölen ve yerinde kemik dokusu gelişen kıkırdak hücrelerinin kaybı, modelin epifizleri ile diyafizi arasındaki kondrositlerin hızlı mitoz bölünmeleriyle telafi edilmeye çalışılır. Mitozla çoğalıp alt alta dizilen kondrositler birbirine paralel seyreden hücre kordonları (izogen gruplar) oluştururlar. Bu çoğalmalara bağlı olarak kıkırdak taslağın boyu devamlı uzar. Ancak bu merkezlerin ortaya çıkışı bir kemikte bile aynı zamanlara isabet etmez. Sekonder kemikleşme merkezlerindeki kemikleşme, diyafizdekinden farklı olarak ışınsal yönde bir büyüme gösterir; bu yüzden epifizler şişkin bir biçim alırlar. Uzun ve kısa kemiklerin epifizlerindeki kemikleşme eklem yüzeylerine kadar devam etmez; bu kısımda kıkırdak bir bölge kalır ve büyümenin tamamlanmasından sonra eklem kıkırdağı olarak varlığını sürdürür. Primer ve sekonder kemikleşme merkezleri arasında, kemiğin uzamasına hizmet eden ve epifiz plağı adı verilen kıkırdak bir alan bulunur. Kemikleşme sona erinceye kadar epifiz plaklarındaki kıkırdak hücreleri diyafiz yönünde bölünüp çoğalarak sürekli kıkırdak dokusu yaparlar. Bu kıkırdak dokusu da devamlı olarak yerini kemik dokusuna bırakır (5-7).



Görsel 2: Endokondral kemikleşme

2.2 KRİTİK BOYUT KEMİK DEFEKTİ

Kemik defektleri yaygındır ve kemik kaybı olan yüksek dereceli açık kırıklar, yüksek enerjili travmalar, patlama yaralanmaları, kemiğin debridmanını gerektiren enfeksiyon ve kemik tümörlerinin rezeksiyonu dâhil olmak üzere birçok klinik durumda ortaya çıkar. Özellikle kemik defekti kritik boyutta ise, kemik defektlerinin tedavisi ile ilişkili önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Bir kaynamama/nonunion ile kritik boyuttaki kemik defektinin aynı olmadığını fark etmek de gereklidir. Kaynamama durumunda, genellikle kemik defekti olmayan bir hücresel ve moleküler sinyal ve biyomekanik kararsızlık vardır, buna karşın KBD genellikle uygun bir biyolojiye sahip olan ancak yumuşak doku ortamı ve hastaya ait faktörler sebebi ile komplike olabilen önemli kemik kaybının yerine konamadığı durumdur (8-9).

Defektin çevresel olup olmamasına göre değerlendirilen mutlak ve göreceli büyüklük, anatomik lokasyon (diyafizyal / metafizyal / artiküler), periost yaralanmasını da içermesi, yumuşak doku ve kas ortamı, hasta yaşı, kronik hastalıkları ile diğer komorbiditelerin olması gibi kemik defektlerini ve bunların “kritik boyutlarını” etkileyen birçok faktör vardır (8-9).

Kritik boyut kemik defekti, kendiliğinden iyileşmeyen ve genellikle 6 cm olarak tanımlanan en küçük kemik defekti olarak tanımlanır. Bununla birlikte daha mantıklı olarak,

ilgili kemik diafiz çapının 2.0 ile 2.5 çarpılması şeklinde tanımlanan aralık da kritik boyut kemik defekti olarak ifade edilebilir (10).

Bir kemik defektinde gerçekleşecek iyileşme miktarı, büyük oranda defektin büyüklüğüne bağlıdır. Bu nedenle iyileşmenin değerlendirilmesi için kullanılan deneysel kemik defekti, spontan iyileşmeye engel olmak için yeteri kadar büyük olmalıdır. Bu noktada bir implant veya greftin osteojenik potansiyeli tam olarak değerlendirilebilir. Bu özelliklere sahip deneysel kemik defekti KBD olarak adlandırılmaktadır ve osteojenik materyallerin değerlendirilmesinde standart bir model olarak Hollinger ve Kleinschmidt tarafından önerilmiştir. KBD, bir hayvan türü ve o hayvan türündeki ilgili kemikte, hayvanın hayatı boyunca spontan olarak iyileemeyecek en küçük intraosseöz defekt olarak tanımlanabilir. Bununla birlikte pek çok çalışmada sürenin sınırlı olması ve hayvanın tüm hayatı boyunca uzatılamamasından dolayı hayvan çalışmalarında KBD, çalışmanın süresi boyunca iyileşmeyen defektleri ifade etmektedir. KBD'nden daha küçük defektlerin çalışmanın süresi boyunca spontan iyileşmesi gerçekleşmektedir (11).

zet olarak, kritik boyutlu kemik defektlerinin tanısı konusunda çok az kanıt ve az görüş birliği vardır. Çoğu uzun kemiklerde iyi tanımlanmamıştır, etiyoloji çok faktörlüdür ve daha küçük kusurların doğal gelişimi beklenenden daha iyidir (9).(Görsel 3: KBD)



Görsel 3: Tarafımızca rat femurunda, steril şartlarda oluşturulmuş KBD.

2.3 KAYNAMAMA VE PSÖDOARTROZ TANIMI VE TİPLERİ

2.3.1 NONUNION (PSÖDOARTROZ)

FDA, kaynama yokluğunu, kırılmış bir kemiğin dokuz ay içinde tam olarak iyileşmemesi ve üç ardışık ay içerisinde, her ay çekilen seri radyograflerinde iyileşme yönünde ilerleme göstermemesi olarak tanımlasa bile(12), halen kaynama yokluğunu tanımlayacak standart bir ölçüt bulunmamaktadır. Basitçe nonunion kırığın beklenen sürede kaynamamasıdır. Daha genel anlamda nonunion müdahale olmadan kırık iyileşmesinin devam etmeyeceği durumdur (13, 14). Bütün kırıkların % 90-95 i sorunsuz iyileşir (15). Nonunionlar, biyolojik kırık onarımının yerel biyolojiyi ve kemik hasarının mekaniğini aşmadığı vakaların küçük bir yüzdesidir. Kaynama yokluğunun üç tipi şunlardır; hipertrofik, oligotrofik, atrofik.

Hipertrofik kaynama yokluklarının biyolojik olarak bir iyileşme kapasitesi ve yetersiz mekanik desteği vardır; bunlar, aşırı kallus oluşumu ve köprüleşme eksikliği ile karakterizedir. Oligotrofik kaynama yoklukları, iyileşme için biyolojik kapasiteye sahiptir; iyileşmeyi başlatma becerisi yoktur ve hiçten aza kadar kallus oluşumuyla karakterizedir. Atrofik kaynama yokluklarının iyileşme kapasitesi çok azdır ya da hiç yoktur ve kallus oluşumu olmaksızın sklerotik kemik uçları ve yalancı kaynama ile karakterizedir.

Kaynamamaları temel olarak biyolojik olarak aktif olanlar (canlı/vasküler) ve biyolojik olarak aktif olmayanlar (cansız/avasküler) olarak iki ana gruba ayıran Weber ve Cech'in 1976 da yaptığı sınıflama hala geçerliliğini korumaktadır (16). Genel olarak bakıldığında, avasküler kaynamamalar kırık iyileşmesinin erken aşamaları üzerine etki eden olumsuz faktörler sonucu oluşurken, vasküler kaynamamalar sıklıkla kırık iyileşmesinin yeniden şekillenme (reorganizasyon) dönemine etki eden faktörler sonucu oluşmaktadırlar (17).

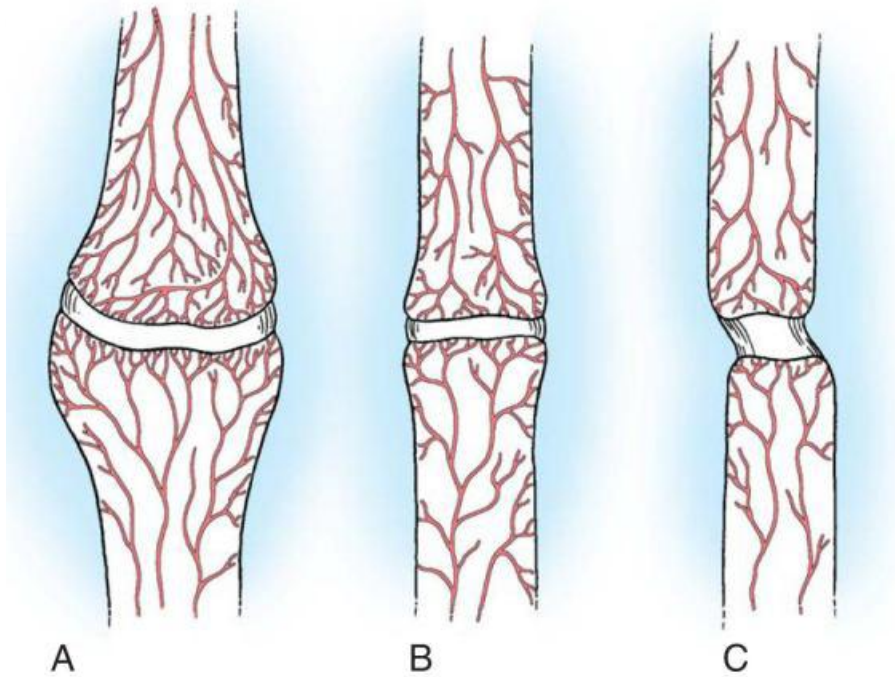
2.3.1.1 VASKÜLER KAYNAMAMALAR

Kallus yanıtının iyi olduğu yani kırık parçalarının biyolojisinin iyi olduğu kaynamamalardır. Burada sorunun çoğu mekanik denge kaynaklıdır. İyi kanlanan bir dokudaki hareket periostu uyarak yeni kemik oluşumunu tetiklemektedir. Yeterli denge olsa kemik kaynamaya hazırdır. Dolayısıyla mikro ya da makro-hareketin kırık iyileşmesi ile uyumlu kritik eşik seviyenin altına indirilmesi gerekmektedir. Sintigrafik olarak

kanlanmalarının iyi olması nedeniyle yüksek aktivite gösterirler. Olgular genellikle uzuvlarını kullanabilirler ancak yorulma ya da yüklenme ile ağrı oluşması önemli bir bulgudur. Radyolojik görünüme göre fil ayağı, at ayağı ve oligotrofik olarak üç alt gruba ayrılırlar (18) (Görsel 4).

Fil ayağı kaynamamaların özelliği hipertrofik ve zengin bir kallus oluşumudur. Sıklıkla yetersiz tespit ya da erken yük verme nedeniyle oluşurlar.

At ayağı kaynamamalarda ise kallus birinciye göre daha azdır. Sebep çoğunlukla başarısız plak-vida tespitidir. Metalin dayanabileceği sürede kaynama gerçekleşmez ise tespit materyali kırılır. Bu tip kaynamamaların tedavisinde biyolojiyi iyileştirici bir ek tedaviye ihtiyaç duyulmaz asıl gerekli olan mekanik olarak varsa şekil bozukluğunun düzeltilmesi ve kaynamama sahasındaki dengenin artırılmasıdır. Bu da kompresyon plaklama ya da oymalı kilitli intramedüller çivileme gibi internal ya da Ilizarov gibi fiksatörlerle eksternal olarak sağlanabilir. Ancak yeterli denge sağlandıktan sonra fibroz kıkırdak kalsifiye olabilir ve yeni damarların penetrasyonu sonucu remodelasyon süreci işleyebilir. Kırık uçlarında rezeksiyon yapılması, canlı kemik dokuda kayıplara sebep olacağı için hatadır (18).

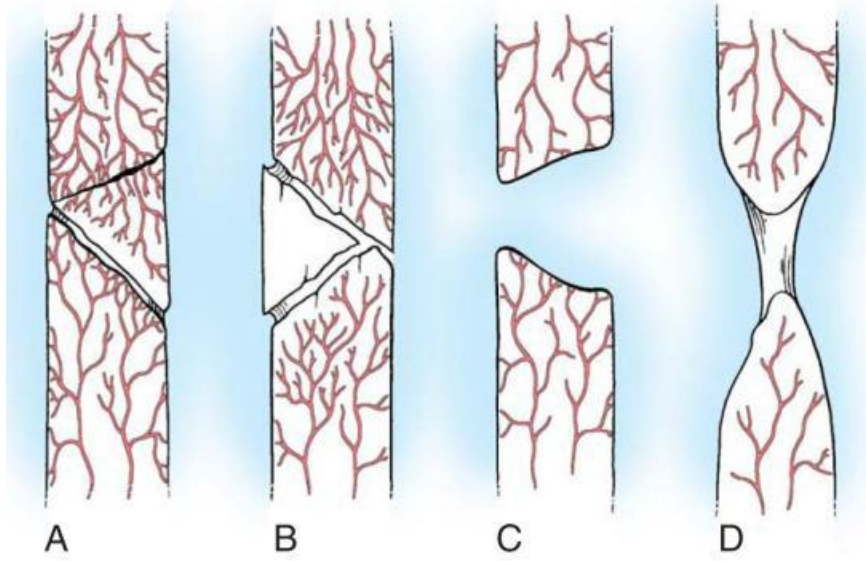


Görsel 4: Hipervasküler (hipertrofik) kaynamamış kırıklar: A. Fil ayağı tipinde kaynamamış kırıklar, B. At ayağı tipinde kaynamamış kırıklar, C. Oligotrofik kaynamamış kırıklar.

Oligotrofik kaynamamalarda ise kallus görülmez. Kırık uçları canlı olmasına rağmen kaynamamanın sebebi tespitin kırık uçları arasında kabul edilemez boşluklar bırakacak şekilde yapılmış olmasıdır. Kallusun yokluğu kaynamama sahasında hareketliliği arttırarak kemik iyileşmesi için uygunsuz bir ortam yarattığından dengenin arttırılması tedavi için şarttır. Vasküler olmalarına rağmen kemik oluşturmamaları için kemik oluşumunu uyaran osteoprogenitor hücrelerin, osteoindüktif proteinlerin ve osteokondüktif matriksin elde edilebilmesi amacıyla dekortikasyon ve otojen kansellöz greft uygulanması önerilmektedir.

2.3.1.2 AVASKÜLER KAYNAMAMALAR

Bu kaynamama tipinde kemik parçaları cansızdır dolayısıyla biyolojik herhangi bir reaksiyon oluşturma kapasitesine sahip değildirler. Sintigrafik olarak zayıf kanlanmaları nedeniyle düşük aktivite gösterirler. Direkt grafilerde kallus görülmez. Cansız kaynamamalar 4 alt tipe ayrılır. Kama şeklindeki cansız kaynamamalarda kanlanması bozuk bir ara parça mevcuttur. Bu parça ana parçalardan birine kaynarken diğerine kaynamaz. İkinci tip olan parçalı kaynamalarda nekrotik parça sayısı birden fazladır. Üçüncü tip kayıplı (defekt) kaynamamalardır. Açık kırık ya da enfeksiyona ikincil olarak bir parça kaybı söz konusudur. Başlangıçta kırık uçları canlı olsa da kaybın büyüklüğü kırık iyileşmesinin köprüleyebileceği mesafenin üstündedir. Zamanla bu uçlar da canlılıklarını yitirirler. Dördüncü tip olan atrofik kaynamamalar ise aslında ilk üç tipin zaman içinde geldiği noktadır. Kırık uçlarının uzun süre içinde kısmen incelendiği, uzuvda da kullanılmamaya bağlı kas atrofileri ve osteoporozun geliştiği genel bir tablodur (18) (Görsel 5). Oluşum sebebi esas olarak kırık hattına komşu kemik parçalarının yaralanmanın şiddeti ya da kötü cerrahi teknikler neticesinde cansız hale gelmesidir. Kaynamanın sağlanabilmesi için sadece tespitin dengelenmesi yeterli değildir. Cansız kemiklerin uzaklaştırılması, kırık uçları arasındaki fibrotik dokuların temizlenmesi, canlı kemik uçlarının temasının sağlanması ve ilave olarak greftleme ile biyolojik canlandırmada tedaviye eklenmelidir. Cansız bir kemik de canlı bir kemiğe kaynayabilir ancak bunun olmasını sağlayan, nekrotik parçaları uzaklaştıran yeniden şekillenme sürecinin zaman içinde kısalık ve distal parçada osteopeniye yol açacağı unutulmamalıdır. Tedavi seçenekleri içinde seçim kemik kaybının büyüklüğüne göre yapılmalıdır. Bunlar basit kısaltma, karşılıklı kısaltma, kısaltma ve uzatma(kallus distraksiyon) ya da defektli sahanın canlı kemikle köprülenmesi(tibia pro fibula) olabilir.



Görsel 5: Avasküler (atrofik) kaynamamış kırıklar: A. Torsiyonel kama parça içeren kaynamamış kırıklar, B. Parçalanmış kaynamamış kırıklar, C. Defektli kaynamamış kırıklar, D. Atrofik kaynamamış kırıklar

2.4 KAYNAMAMA VE PSÖDARTROZ TEDAVİ SEÇENEKLERİ

2.4.1 CERRAHİ DIŞI TEDAVİ

Cerrahi dışı müdahaleler var olan iyileşme sürecini hızlandırabilir veya iyileşme olmayan durumlarda iyileşmeyi başlatabilir. Cerrahi dışı tedaviler direkt ve indirekt girişimler olarak ikiye ayrılır.

2.4.1.1 İNDİREKT GİRİŞİMLER

Yeterli beslenme, kemik dâhil tüm dokuların iyileşmesi için en temel ihtiyaçtır. İyileşmeyi en uygun düzeyde tutmak için yeterli kalori, vitamin ve protein alınmalıdır (19).

Sigara içenlerde kaynamama veya geç kaynama oranları daha yüksek olarak bildirilmiştir ve bu durumun içilen sigara sayısı ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (20-21).

Diyabet gibi sağlık sorunları da kemik iyileşmesini etkiler ve kaynamama riskini artırır. Diyabet yanında bir veya daha fazla sağlık sorunu olan hastalar kaynamama gelişimi açısından daha yüksek riske sahiptir. Beslenme değişiklikleri ve kan şekeri düzeylerinin kontrol altında tutulması kırık iyileşme sorunlarını azaltmada yardımcı olur (22). Nikotine ek olarak steroidler, fenitoin, kemoterapötik ajanlar, non-steroid anti inflamatuvar ilaçlar ve bazı antibiyotikler (florokinolonlar) gibi ilaçlar kemik iyileşmesini olumsuz yönde etkileyebilir (23).

2.4.1.2. DİREK GİRİŞİMLER

Kaynamama için yapılan direk girişimlerden en basit ve uzun süredir kullanılan yöntem fonksiyonel alçı ile yük verilmesine müsaade etmektir. Kapasitif eşleme, doru akım ve indüktif eşleme gibi birçok elektrikle uyarma yöntemi kullanılmaktadır. Kırık bölgesinde elektrik potansiyelinin değiştirilmesi ile kaynamayı sağlamayı amaçlamaktadır (24,25). Düşük yoğunlukta ultrasonun kırıklarda kaynama hızını arttırdığı gösterilmiştir. Taze kırıklarda düşük yoğunlukta ultrason kullanımı ile kaynama süresinin kısaldığını gösteren çalışmalar yayınlanmıştır (26,27). Cerrahi tedaviler ile karşılaştırıldığında en önemli dezavantajları kaynamanın sağlanması için gereken sürenin daha uzun olmasıdır.

2.4.2 CERRAHİ TEDAVİ

Kaynamamanın cerrahi tedavisindeki temel amaç kemik iyileşmesinin sağlamaktır. Kırık tedavisindeki temel prensipler kaynamamaların tedavisinde de geçerli olduğundan seçilecek tespit şekli, akut kırık tedavisinde kullanılan tekniklerin aynısıdır(Örneğin tibianın middiafizler kapalı kırığı için intramedüller çivi tercih edilmesi gibi) (28) . Tam bir tanı için kaynamama atrofik, oligotrofik, hipertrofik ve psödoartroz oluşuna göre sınıflandırılmalı, vasküler veya avasküler olduğu, septik veya aseptik olduğu belirlenmeli ve eşlik eden deformite tespit edilmelidir. Kaynamamanın sınıflandırılması bölgede iyi temizlik ya da kemik grefti gerekip gerekmeyeceği konusunda yol gösterir. Hipertrofik kaynamamalarda biyolojik kaynama kapasitesi mevcut iken, mekanik stabilite yetersizliği nedeniyle kaynama sağlanamaz. Bu nedenle hipertrofik kaynamamalarda tedavi mekanik stabilitenin artırılması yönünde olacaktır. Hipertrofik kaynamamalarda biyolojik iyileşme potansiyeli olduğundan, kaynamama bölgesinin debridmanı ve kemik greftlenmesi zorunlu değildir. Psödoartrozlar canlı ve atrofik kaynamamalar cansız kabul edilmesine rağmen her ikisinde de kaynamama bölgesinin debride edilmesi gerekir. Atrofik kaynamama tedavisinin temel ilkesi, ölü kemik uçlarını temizleyerek kanayan sağlıklı kemiği ortaya çıkarmaktır. Her iki kaynamama tipinde de kemik greftlenmesine ihtiyaç duyulur. Kaynamama tedavisinde bir diğer önemli genel kural da enfeksiyon kontrolü ve tercihen ortadan kaldırılmasıdır. Enfeksiyon olmadığında ciddi ve kompleks kaynamamalar iyi bir şekilde tedavi edebilirken, enfeksiyon varlığında basit kaynamamalar bile tedaviye dirençli hale gelir. Eğer hastada enfeksiyon varlığı varsa nonunion tedavisinden önce enfeksiyon tedavisi yapılmalıdır. Bölgedeki implantların çıkarılması ve sağlıklı bir çevre elde edene kadar seri debridmanlarda nekrotik yumuşak dokular ve kemiğin uzaklaştırılması ilk adım olmalıdır. Enfeksiyonla mücadeleye yardımcı olacak stabilizasyonun sağlanması için eksternal fiksatörler tercih edilebilir. Ancak

antibiyotik kaplı İM çiviler kullanılabilecek seçenekler arasında yer almaktadır (29,30). Enfeksiyon tedavisi etkene özgü parenteral antibiyotikle 6 hafta devam eder. Enfeksiyonun kontrol altına alındığı klinik ve laboratuvar verileri ile doğrulandığında kaynamama tedavisinin son aşaması uygulanabilir. Eksternal fiksasyondan internal fiksasyona geçerken 2 aşamalı tedavi uygulanır. Eksternal fiksator çıkarılır pin diplerinin iyileşmesini sağlamak için hasta atelet alınır ve bir müddet beklenir. Pin dipleri kapandıktan sonra hastanın nihai tedavisi uygulanır.

2.4.2.1 KAYNAMAMA TEDAVİSİNDE PLAK VİDA KULLANIMI

Plak ve vidalar ile nonunion tedavisi çoğu anatomik bölgede rahatlıkla kullanılabilir. Plaklar distal kaynamamaların yanı sıra diafizler bölge kaynamamalarında da kullanılabilir. Her ne kadar, intramedüller çivileme femur, tibia ve bazen humerus akut middiafiz kırıkları için tercih edilen tedavi yöntemi olsa da, bu bölgelerde plak fiksasyonu da kullanılabilir (31,32). Plaklar ile kaynamama tamiri sonrası yumuşak doku bakımına özen gösterilmelidir. Genellikle geniş insizyonlar ile uygulandığından, cerrahi sonrası ciddi komplikasyonlar ile karşılaşılabilir. En önemli dezavantajları intramedüller çivilemeler kadar minimal invaziv bir teknik olmaması buna bağlı yumuşak doku komplikasyonlarının daha sık görülmesidir. Ancak yumuşak doku problemi olmayan durumlarda plaklar her tip kaynamamada kullanılabilir.

2.4.2.2 KAYNAMAMA TEDAVİSİNDE İNTRAMEDÜLLER ÇİVİ KULLANIMI

Psödoartroz tedavisinde başarılı bir cerrahi sonucun anahtarı, minimal yumuşak doku hasarı ve yeterli fakat en az metalik cihaz kullanımı gerektiren rijit fiksasyondur. İntramedüller çivi kaynamama tedavisinde 3 tip kaynamama durumunda kullanılır.

- 1) Öncesinde çivi yapılmamış kaynamamalarda çivileme
- 2) Önceden çivi yapılmış ve kaynaması olmayan hastalarda çivi değişimi
- 3) Dinamizasyon.

Bu uygulamalardan hangisi yapılacak olursa olsun çivi tedavisi en çok uzun kemiklerin diyafizleri için uygundur. İntramedüller çivi ile tedavi edilen kaynamamalarda en iyi sonuçlar distal femur ve distal tibia kaynamamalarının tedavisinde elde edilmiştir (33,34). Tibia ve femur için çoğunlukla başarılı sonuçlar bildirilmiştir, ancak humerus kaynamamalarında çivi değişimi ile kemik greftleme yapılmadığı takdirde daha kötü sonuçlar

elde edilmiştir (35). Çivi değişimi, çivi yetersizliğinin daha kalın çapta oymalı bir çivi ile giderilebildiği kaynamamalarda uygun bir seçenektir. Yetersiz nedeni, gerekenden daha kısa ve küçük çapta çivi kullanımına bağlı stabilite eksikliği veya kilitleme vidasının kullanılmamasına bağlı rotasyonel instabilitedir. Oyma işlemi periosteal kan akımını arttırarak ve yeni kemik oluşumunu uyararak biyoloji üzerinde olumlu etkilerde bulunurken (36), daha geniş çaplı çivi uygulanması da kortikal teması arttırarak mekanik denge üzerine olumlu etkiler oluşturur(37). Ayrıca oyma işlemi esnasında oluşan ve içinde osteoblastları ve kök hücreleri barındıran debrislerinde kemik grefti etkisiyle kaynamama bölgesinde medüller iyileşmeye pozitif etkilerinin olduğu literatürde gösterilmiştir (38,39). Mekanik denge yeniden çivileme esnasında çivi çapını arttırmanın dışında çivi boyunu uzatarak ya da kilitleme vidalarının sayısını arttırarak da olumlu yönde değiştirilebilir. Uzun kemiklerin diyafiz kırıklarında altın standart intramedüller çivileme olduğu için kaynamamada çivi değişimi primer intramedüller çivilemeden daha sıktır. Primer intramedüller çivileme daha çok konservatif tedavi uygulanıp kaynamanın sağlanamadığı tibia ve humerus şaft kırıklarında kullanılır. Hem biyoloji hem de mekanik üzerine olumlu etkileri nedeniyle kanal içi çiviler hem atrofik hem de hipertrofik kaynamamalarda kullanılabilirler (40). Serilerde kaynama oranları % 75-90 arasında, Femur ve tibia kaynamamalarında çivi değişimi sonrası kaynama oranları %50 ile %90 arasında değişmektedir (41-43). Ancak kanal içi çivilemenin kortikal çapın % 30-50'sine ulaşan kemik kayıplarında ve parçalı kırıklar sonucu oluşan kaynamamalarda kullanılması çok uygun değildir (44). Ayrıca açılanma ya da kısalık varsa çivi değişiminden önce bu sorunların osteotomilerle ya da uzatmalarla düzeltilmesi önerilmektedir (45). Geçirilmiş enfeksiyon öyküsü olan kaynamamalarda kullanımı ile ilgili henüz bir fikir birliği oluşmamıştır (29, 46). Çivi değişimindeki oyma işlemi ile bir miktar lokal kemik grefti birikir bu greftin iyileşmeyi hızlandırdığı bildirilmiştir (47). Ancak bu lokal kemik grefti büyük defektler için yeterli değildir. Bu nedenle çivi değişimi, açık kemik greftleme işlemi yapılmayacaksa, kemik kaybı olmayan durumlar için daha uygundur. Kilitli intramedüller çivilemenin diğer cerrahi tedavilere göre belirgin üstünlükleri vardır. Fiksasyon materyalinin mekanik olarak daha güçlü olması, implant yetmezliği sorunlarının çok ender görülmesi, ameliyat sonrası dönemde alçı, atel, breys gibi eksternal tespit gereçlerine ihtiyaç duyulmaması, yumuşak doku hasarı az olduğu için kanlanmanın daha fazla olması ve bunun sonucu kırık iyileşmesinin hızlanması, erken hareket verilebildiğinden daha iyi fonksiyonel sonuçlar ve erken işe dönmeye olanak tanınması, yapılan minimal insizyon sonucu kanama miktarı ve ameliyat süresinin kısa olması, enfeksiyon oranının düşük olması, açısal deformite derecesi ve sıklığının az olması yöntemin önemli üstünlükleridir. Dinamizasyon çivinin bir

ucundaki kilitleme vidalarının çıkarılarak yük verme ile aksiyel kısılmanın sağlanmasıdır. Dinamizasyonla kırık hattındaki defekt küçültülerek kaynama sağlanmaya çalışılır. Kaynamama ve gecikmiş kaynama olgularının %50 sinde dinamizasyon ile kaynama sağlandığı bildirilmiştir (40, 48,49).

2.4.2.3 KAYNAMAMA TEDAVİSİNDE EKSTERNAL FİKSATÖR KULLANIMI

Kırıkların tedavisinde çok farklı ekstrenal fiksator tipleri kullanılmasına rağmen sıklıkla tercih edilen yöntem Ilizarov'dur. Son zamanlarda, kırık kaynamamalarının tedavisinde Ilizarov eksternal fiksator uygulamaları, çok yönlü yaklaşım olarak değer kazanmıştır. Kırık parçalarının, eksternal olarak düzenlenmesi, gerektiğinde segmentlerin pozisyonlarının değiştirilmesi, ekstremité uzunluğunun ayarlanması, bu şekilde biyomekanik çevrenin değişmesi ve kontrolü, yöntemin en büyük üstünlüklerindendir (50,51). Ilizarov ve arkadaşları, 1950'den beri, kendi uyguladıkları yöntem ve fiksatorle, aynı anda, hastanın günlük aktivitelerini kısıtlamadan, eklem fonksiyonlarını koruyarak kaynamayı başarmış, deformiteyi düzeltmiş, uzunluğu yeniden sağlamıştır. Yine bu yöntemle kemik defektleri giderilmiş ve enfeksiyon ortadan kaldırılmıştır. Ana fikir olarak distraksiyonun dokulardaki canlandırıcı ve gençleştirici etkisine dayanır. Yöntem batıya geldikten sonra hidroksiapatit kaplı yarım çiviler, karbonfiber halkalar ve Stewart Gough menteşeleri gibi teknolojik ilerlemeler kaydetse de temel felsefesi değişmemiştir (52). İnce tellerin kullanıldığı fiksatorler el, ayak hatta klavikula gibi uzun kemiklerin kaynamamalarında kullanılabilir (53-55). Distraksiyon osteogenezisinin ve/veya kemik taşınmasının gerekli olduğu ciddi kemik kaybı olan olgularda, çevre yumuşak dokularda yaralanma sonucu oluşan ağır nedbe dokularının varlığında ve canlı kemikte enfeksiyon varlığında birincil tespit yöntemi olarak tercih edilmelidir. Bu tip olgular tüm cerrahi ile tedavi edilen kaynamamaların yaklaşık olarak % 5'ini oluşturmaktadır (56). Uzun tespit süreleri, ağır ve çivi yolu problemleri bu tespit şeklinin dezavantajlarıdır. Kemiğin belirgin şekilde cansız olmadığı enfekte kaynamamalarda Ilizarov yöntemi ile elde edilen stabilite, kortikotominin yarattığı kanlanma ve kaynama süreci ilerledikçe gelişen kemik içi dolaşımın yeniden oluşması enfeksiyonun gerilemesine yardımcı olur. Ancak bu sayılan etkilerden hiçbirinin ölü bir kemikteki osteomyelit üzerine etkili olamayacağı unutulmamalıdır. Bu durumda tedavi seçeneği rezeksiyondur. Ilizarov, kaynama yokluklarını, sert (hareketsiz ve çok az hareketli) ve gevşek (hareketli) olmak üzere iki gruba ayırmıştır. Klinik olarak yapılan bu sınıflandırma, tedavinin şeklinin belirlenmesinde son derece önemlidir (57). Sert kaynama yokluğu, radyolojik olarak hemen her zaman hipertrofik olarak gözlenir. Kırık bölgesindeki damarlanma, bol miktardaki yeni

kemik oluşumu ile oldukça belirgin ve fazladır. Kaynamama bölgesindeki fibro-kartilajinöz yumuşak doku interpozisyonu, aksiyel yönde uygulanan kompresyon ve distraksiyonla solid kemik yapıya dönüşür. Ekstremitenin düzgün fonksiyonunu sağlamak için yük ekseninin yeniden düzenlenmesi gerekir. Makaslama kuvvetleri, kallus oluşumunu bozarak, kaynamayı engeller. Dolayısıyla, bu kuvvetler ortadan kaldırılarak, sadece kompresyon – distraksiyon kuvvetlerini ortaya koymak gerekir. Radyografide atrofik olarak gözlenen hareketli, gevşek kaynama yoklukları ise daha çok segmentlerin damar yapısının harap olduğu kırıklarda oluşur. Bu kaynamamaların tedavisinde, kırık stabilitesinin yeniden sağlanmasının yanında, osteogenez için biyolojik bir uyarana da ihtiyaç vardır. Ilizarov yönteminde, bu uyarı, kortikotomi ile distraksiyon ve kaynamama bölgesine uygulanan ilerleyici kompresyonla oluşturulur. Dikkat edilmesi gereken nokta kırık uçlarının sklerotik olduğu durumlarda distraksiyona başlamadan önce bir süre kompresyon uygulanması önerilmektedir(52). Kortikotomi ve takiben yapılan distraksiyonla, segmentin tamamında vasküler yapı artar. Kaynamama bölgesine uygulanan kompresyon ise segmentlerin stabilitesini artırır (58).

Ilizarov ile kaynamama tedavisinin en önemli avantajları tamir yönteminin daha az yumuşak doku hasarına neden olması ve var olan deformitenin tedrici olarak düzeltilebilmesidir. Bu sayede akut deformite düzeltilmesi ile oluşabilecek yumuşak doku gerginliklerinden kaçınılmış olur. Bunların yanı sıra, ince düzeltmelerin yapılabilmesi ve erken yük vermeye olanak sağlaması başlıca avantajlarındandır.

2.4.3 KAYNAMAMA TAMİRİNE EKLER

2.4.3.1 OTOJEN KEMİK GREFTLEME

Greftlemede otojen kemik grefti klinik standart olmaya devam etmektedir. Otojen kemik grefti osteojenik ve osteokondüktif maddeler sağlar. Büyük boyutlu greftler için iliyak kanat en sık kullanılan bölgedir ve %90'ı aşan kaynama oranlarına sahiptir (31,59). Otojen greftlemenin dezavantajı alınabilecek greft miktarının kısıtlı olmasıdır. Otojen greftleme atrofik ve bazı oligotrofik kaynamamalarda ve bazı psödoartroz tamirlerinde kullanılır.

Yakın zamanda 'Oyucu-İrrigatör-Aspiratör' (Synthes, Paoli, PA) adında femoral kanaldan otojen greft alınmasını sağlayan daha a invaziv bir yöntem sunulmuştur. Cihaz kullanılırken oyma sırasında oluşan parçalar aspiratör ile emilir ve toplanıp greftleme amacıyla kullanılabilir.

2.4.3.2 VASKÜLARİZE GREFTLER

Mikro cerrahi tekniklerindeki gelişmelere paralel olarak vasküler pediküllü serbest kemik greftleri özellikle enfekte ve defektli psödoartrozlarda başarıyla kullanılmaktadır. Vaskülarize greftler en çok segmental defektlerin tedavisinde kullanılır. Bu tarz durumlarda daha avantajlı olmalarının nedeni canlı bir kemik grefti olmaları ve standart iliyak kanat kansellöz otogreftinde bulunmayan yapısal özelliklere de sahip olmalarıdır. İliyak kanat ve kotlar da kullanılabilmesine rağmen fibula en çok kullanılan kemiktir. Greftlenen kemiğin başarılı bir şekilde kaynayabilmesi için her iki uçta da belirli bir derecede hipertrofiye uğramaları gerekir (60). Daha güçlü ve daha hızlı stabilite sağlamak amacıyla kansellöz greftlerle birlikte çift vaskülarize greftler kullanımı önerilmiştir (61). Ancak mikro vasküler anastomozlar gerektirdiği için teknik olarak güç bir işlemdir. Komplikasyonlar arasında tekrarlayan greft kırıkları ve donör alan morbiditesi sayılabilir (62). Bunun yanı sıra özel cerrahi gerektirmesi, uzun süreli tespit, yüksek oranda kaynama güçlüğü, tibia-fibula çap farkı, host kemik bileşkesindeki stres konsantrasyonu nedeniyle kırık riskinin fazla olması yöntemin sakıncaları olarak karşımıza çıkmaktadır (Görsel 6).



Görsel 6: Vaskülerize fibula grefti

2.4.3.3 KEMİK GREFTİ BENZERİ MATERYALLER

Otolog kemik grefti son zamanlarda, kaynamamalarda kemik grefti olarak standart kriter haline gelmiştir. Otolog kemik greftine alternatif olarak, demineralize kemik matriksi (DBM), kemik iliği aspiratı, plateletten zengin plazma, allogreft ve seramikler geliştirilmiş ve kaynamama tedavisinde çeşitli başarı oranları ile kullanılmışlardır.

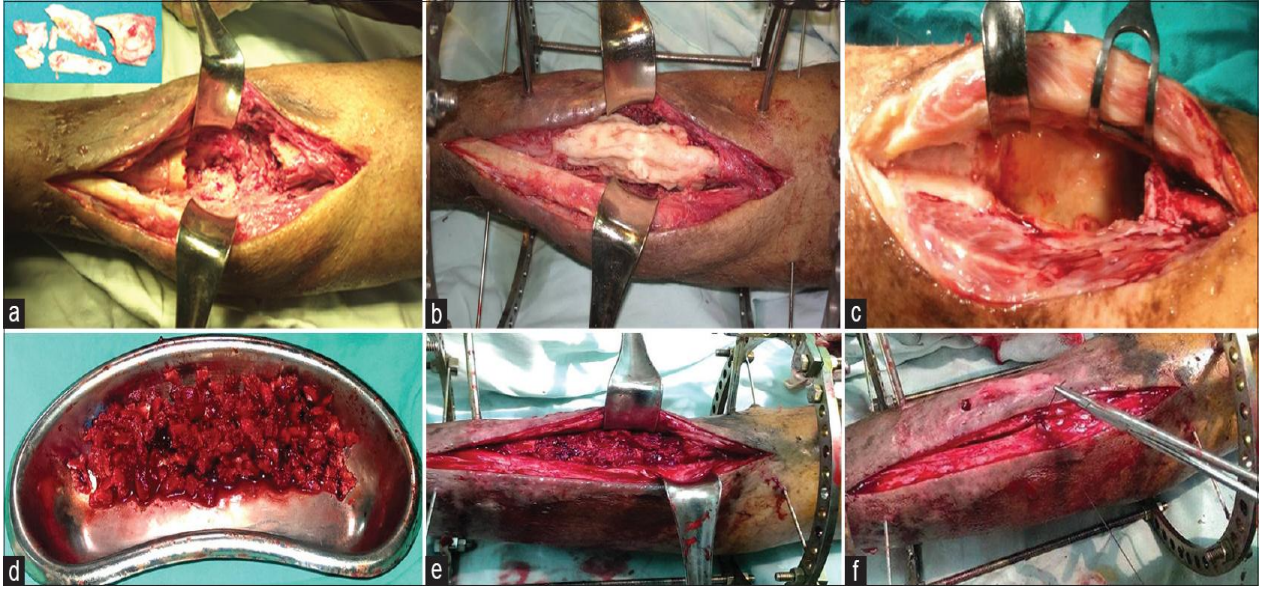
Kaynamama tedavisinde greft benzeri materyallerin avantajları hasta morbiditesinin azalması veya hiç olmaması, ayrıca otolog kemik greftine göre sınırsız miktarda elde edilebilmesidir. Kaynamama tedavisinde ideal greft benzeri madde; ucuz, istenilen miktarda, hazırlaması ve kullanımı kolay, implantasyonu kolay, yan etkisiz ve %100 etkili olmalıdır. Sözü edilen greft benzeri maddelerin her biri bu özelliklerin bir kısmına sahiptir ancak hepsine birden sahip olanı yoktur. Bu maddeler yapılan kaynamama tamirlerinde yüksek oranda iyileşme bildirilmiştir ancak direkt olarak otolog kemik grefti ile karşılaştırma yapılan çalışma çok azdır(63,64,65).

iliyak kanattan alınan kemik iliği aspiratının, osteoprogenitör hücreler içerdiği ve hem osteojenik hem de osteoindüktif özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (66). Ancak optimal sonuçların elde edilmesi için konsantre hücrelerin kaynamama böylesine açık debridman sonrası osteokondüktif bir taşıyıcı ile birlikte uygulanmasının mı, yoksa bu bölgeye perkütan olarak direkt enjekte edilmesinin mi faydalı olacağı konusunda tartışmalar mevcuttur (67).

Trombositten zengin plazma (PRP) periferik kanın santrifüje edilmesi ile oluşan berrak plazma ile eritrositler arasındaki ince tabakadan alınır. Bu sıvı osteoblast proliferasyonu ve diferensiyasyonunu uyardığı düşünülen konsantre trombositler içerir (68). Ancak şu anda PRP'nin kaynamama tedavisinde kullanımını destekleyen güncel klinik kanıtlar bulunmamaktadır. Seramikler (kalsiyum sülfat, kalsiyum fosfat, beta trikalsiyum fosfat ve hidroksiapatit gibi) ve allogreftler gibi diğer kemik grefti benzeri materyaller osteoindüktif ve osteojenik özelliklere sahip değildirler ve kaynamama tedavisinde kemik iyileşmesini uyarmada çok az role sahiptirler. Bu materyaller öncelikle osteokondüktiftirler ve osteoindüktif bileşenlerle birlikte kullanıldıklarında hacim arttırıcı veya taşıyıcı olarak faydalıdır.

2.5 MASQUELET TEKNİĞİ

Masquelet ve ark. 1986'da geliştirdikleri bu teknik, kemik defektlerinin rekonstrüksiyonunda kabul görmüş, basit ve etkili bir yöntemdir. Masquelet ve arkadaşları bu tekniği başlangıçta sadece enfekte kaynamamaya bağlı kemik kaybı için tanımlamışlar, fakat zaman içerisinde bu yöntem, nedeni ne olursa olsun, birçok kemik defekti rekonstrüksiyonunda da kullanılmaya başlanmıştır. Teknik olarak çok karmaşık olmayan ve yüksek cerrahi beceri gerektirmeyen bu yöntemin başarısı için, prensiplere kesinlikle uyulmalıdır (3) (Görsel 7).



Görsel 7: Masquelet tekniğinin uygulanışını gösteren sıralı resimler.

2.5.1 MASQUELET TEKNİĞİ İLE KEMİK DEFİKTLERİNİN TEDAVİSİ

Uzun kemiklerin geniş diyafiz defektlerinin rekonstrüksiyonu genellikle kemik kaybının etiyojisi ne olursa olsun ekstremité kurtarma için en büyük zorluktur. En sık ve en yaygın kullanılan metotlar vaskülerize fibula grefti ve Ilizarov ile distraksiyon osteogenezi işlemidir. Kemik otogreftleri, defekt 4-5 cm üzerinde olduğu zaman önerilmez. Çünkü diyafizel defekt 5 cm üzerine çıktığı zaman greft iyi kanlanan bir kas dokusu zarfı içinde dahi olsa rezorpsiyona uğrar ve kaynama gerçekleşmez (69,70). Masquelet indüklenmiş membran ve kansellöz otogreftlerin kombine edildiği bir prosedür önermiştir (71). Masquelet ilk olarak bu tekniği 1986'da 4-25 cm arasında değişen defektleri olan 35 vakada başarılı bir şekilde uyguladığını bildirmiştir (72,73). Hatta bu tekniğin defekt alanı enfekte olsa veya radyoterapiye maruz kalsa dahi otogrefti koruyacak membranı oluşturduğu bildirilmiştir (2,72).

2.5.2 TEKNİĞİN PRENSİPLERİ

Rekonstrüksiyon iki farklı cerrahi aşama gerektirir. İlk aşamada radikal debridman sonrası defekt PMMA çimento spacer ile doldurulur. Spacer dokuda yabancı cisim reaksiyonu oluşturur ve çimentonun üzerini yabancı cisim reaksiyonuna bağlı bir membran kaplar. 6-8 hafta sonra ikinci aşamada çimentonun üzerini kaplayan membrana zarar vermeden çimento çıkarılır ve kaviteye iliyak kanattan alınan otolog kemik grefti uygulanır. iliyak greftin yeterli olmadığı zaman kansellöz kemik grefti 3'e 1 oranla karıştırılarak da kullanılabilir (73). İlk aşamada çimento uygulanırken ikinci aşamada membranın zarar

görmekten kaldırılabilmesi için sadece defekte değil etraf kemik dokuya da sürülmesi gerekir. Ayrıca ikinci aşamada greft uygulandıktan sonra membranın ve etraf yumuşak dokunun greftin sınırlandırılabilmesi için sıkıca dikilmesi gerekir (142).

Çimentonun başlangıçtaki rolü ekstremiteler uzunluğunu sağlamak ve fibroz dokunun yerleşmesini engelleyerek ilerideki greftleme alanını hazırlamaktır. İkinci rolü ise kemik greftini revaskülarize edecek ve rezorpsiyonunu önleyecek membranın indüksiyonunu sağlar(2, 71,73). Klauke ve ark yaptığı bir çalışmada koyunların femurunda 3 cm bir defekt oluşturulup defekt PMMA spacer ile doldurulmuş 1 ay sonra spacer çıkarılıp 1. Grupta membran korunup defekt kemik grefti ile doldurulmuş 2. Grupta membran eksize edilip defekt kemik grefti ile doldurulmuş 3. Grupta membran korunup defekt boş bırakılmış 4. grupta membran eksize edilip defekt boş bırakılmıştır. Takiplerde beklendiği gibi 3. ve 4. Gruplarda kaynama olmazken 1.grupta tamamen kaynama olmuş ve 2.grupta kemik greftinin rezorbe olduğu izlenmiştir (74).

2.5.3 YABANCI CİSİM REAKSİYONU İLE İNDÜKLENMİŞ MEMBRAN OLUŞMASI

Yumuşak doku iyileşmesinin bir parçası olan granülasyon dokusu formasyonu yabancı cisim reaksiyonunda da izlenir (75). Yabancı cisim reaksiyonu yabancı materyalin vaskülerize yumuşak dokuda meydana getirdiği yaralanma ile başlar. Bu yaralanma doku rejenerasyonuna ve granülasyon dokusunun yoğun fibrozis, kemik veya diğer mezenkimal dokuya matürasyonuna neden olabilen bir akut inflamasyon fazını başlatır. Uygun olmayan durumlarda ise kronik inflamasyon gelişir ve doku matürasyon sürecini etkiler. İnflamatuar reaksiyonun derecesi, kalitesi ve süresi doku ortamının optimizasyonu (tüm ölü doku ve enfeksiyonun debridmanı, yeterli vaskülarizasyon) ile değiştirilebilir. Granülasyon dokusunun oluşumundaki hem akut hem de geçici inflamatuvar süreçler, makrofajların varlığı, makrofajların ve fibroblastların infiltrasyonu ile karakterizedir. Kapiller damar oluşumu ve neovaskülarizasyon, olgunlaşan granülasyon dokusunun temel özelliklerinden biridir. Granülasyon başlangıçta hematomdan ve hücre dışı matriks bileşenlerinden oluşan bir doku öncüsüdür ve zamanla neovaskülerize fibroz bağ dokusu membranına dönüşür. Aynı şekilde yabancı cisim reaksiyonunda da granülasyon dokusu yabancı materyali sarar daha sonra inflamatuvar reaksiyonun sonunda bu granülasyon dokusu matür fibroz kapsüle dönüşür (76).



Görsel 8: Rat femurunda kemik çimento üzerinde oluşan İM (BC grubu)

2.5.4 OLUŞAN MEMBRANIN HİSTOLOJİSİ

Masquelet ve ark oluşan membranı 1-2 mm kalınlıkta kemik iyileşmesi için uygun bir çevre sağlayan histolojik özellikleri olarak da sinovyal dokuya benzeyen bir yapı olarak tanımlamıştır. Ayrıca zengin bir vaskülerize yapıya sahip olduğunu ve kemik defekt içine yumuşak doku invazyonunu inhibe ederek otolog kemik greftlerini rezorpsiyondan koruyabileceğini bildirmişlerdir (72). Pelissier ve ark tavşan modelinde PMMA çimento spaceri ektopik olarak subkutan dokuya implante ederek büyüme faktörlerini (BMP-2, TGF β 1, VEGF) salgılayan osteojenik ve vaskülojenik / anjiyojenik özelliklere sahip membranın oluştuğunu ve bu membranın osteoblast diferansiasyonunun arttığını tarif etmişlerdir (2). Viateau ve ark yaptığı çalışmada membranda CBFA1 + hücrelerin bulunduğunu bundan dolayı membranın osteoprogenitör hücrelere sahip olduğunu bildirmişlerdir (77). Henrich ve ark PMMA spaceri ektopik subkutan dokuya değil de farelerin femurunda oluşturdukları defekte implante ederek oluşan membranı hem subkutan dokuda oluşan membranla hem de periostla karşılaştırmışlar ve bu membranın subkutan dokuda oluşan membranla aynı fakat yapısının, kan damarlarının lokasyonunun ve kalınlığının periosttan çok farklı olduğunu bildirmişlerdir (4).

2.6. ANTİBİYOTİKLER

Staphylococcus aureus insanda hastalık yapan patojenlerin başında gelmektedir. 1930'ların sonlarında sulfonamidlerin, ardından penisilinin klinik kullanıma girmesi stafilkokların neden olduğu enfeksiyonların tedavisini mümkün kılmış fakat beraberinde direnç gelişimi de başlamıştır. *S.aureus*, 1950'lerin sonunda, o an için mevcut hemen tüm antibiyotiklere direnç geliştirmişken, bu durum nafsilin, oksasilin ve metisilin gibi yarı sentetik penisilinlerin kullanıma girmesi ile aşılmıştır. Metisilin dirençli ilk *S.aureus* suşu 1961'de izole edilmiş, sporadik enfeksiyonlara neden olan bu suş klinik uygulamada önemli bir problem yaratmamıştır. 1970'lerin sonunda metisilin ve diğeri beta-laktamlar yanında pek çok başka grup antibiyotiğeri dirençli ilk *S.aureus* suşu Avustralya'da izole edilmiştir. Bu suş günümüzde tüm dünyaya yayılmış olup özellikle nozokomiyal enfeksiyonlara yol açmaktadır (78).

2.6.1 FUSİDİK ASİT

FA, bazı ölkelerde Gram pozitif mikroorganizmaların neden olduğu ciddi enfeksiyonların, özellikle MRSA suşlarına karşı tedavisi için klinik uygulamada kullanılır. Bunun nedeni, ilacın düşük toksisite ve bakteri direnci göstermesi, klinik olarak kullanılan diğeri antibiyotiklerle çapraz direnci olmaması ve ayrıca hipoalerjenik bir ajan olmasıdır (79).

Staphylococcus aureus hem toplum hem de hastane kökenli lokal ve sistemik enfeksiyonlardan sıklıkla izole edilen ve metisilin direnci nedeniyle de tedavisi güç olabilen bir mikroorganizmadır (80). Metisiline dirençli suşlarda diğeri birçok antibiyotiğeri direnç olması tedavide farklı antibiyotiklerin kullanılmasını gündeme getirmiştir (81). Fusidik asit protein sentezini inhibe ederek etki gösteren dar spektrumlu, steroid yapıda bir antibiyotiktir (82,83). Fusidik aside klinik uygulama açısından önem kazandıran özelliğeri, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)'nin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilesidir (84)

Beta-laktam antibiyotiklere dirençli *S.aureus*'un neden olduğu enfeksiyonların insidansında ve prevalansındaki artış ve beta-laktam allerjisi nedeniyle stafilkokok enfeksiyonlarının tedavisinde fusidik asidin kullanımı gündeme gelmiştir.

Fusidik asit, *Fusidium coccineum* isimli mantardan izole edilen, steroid yapısında bir antibiyotiktir. Bakteri hücresinde, elongasyon faktör G (EF-G)-ribozom kompleksine bağlanarak EF-G'nin GTPaz aktivitesini inhibe eder ve peptid bağlarının oluşmasını engeller.

Böylelikle protein sentezi durdurulmuş olur (82). Dar spektrumlu olan fusidik asit, metisiline dirençli suşlar da dâhil olmak üzere stafilocok suşlarına, Neisseria türlerine, Bordetella pertussis, Corynebacterium türlerine ve Clostridium türleri gibi bazı Gram-pozitif anaerob bakterilere etkilidir (82). Mikobakterilere, Nocardia türlerine ve Legionella pneumophila'ya karşı etkin olduğu gösterilmiştir (84). Staphylococcus saprophyticus'a, streptokoklara, enterokoklara ve Gram-negatif anaerob bakterilere etkinliği sınırlıdır (82,83). Stafilocoklara ve özellikle MRSA'ya karşı etkinliği nedeniyle Avrupa, Kanada ve Asya ülkelerinde vankomisine alternatif olarak görülmektedir (85)

2.6.2 GENTAMİSİN

Aminoglikozid ailesinin bir üyesi olan gentamisin *Micromonospora purpurea*'den elde edilmiştir. Kimyasal olarak merkezi aminosiklitol halkasına glikosilik bağlarla bağlı iki ya da daha fazla amino şekerden oluşmuşlardır. Bakteri ribozomu 30 S alt birimine geri dönüşümsüz olarak bağlanarak ribozomlarda protein sentezini inhibe ederler. Streptomisin dışındakiler 50 S alt-birimine de bağlanabilirler. Protein sentezini inhibe eden diğer antibiyotikler bakteriyostatik olarak etki gösterdikleri halde aminoglikozidlerin bakterisidal etkili olmaları olasılıkla geri dönüşümsüz bağlanma ve olası hücre membranı etkileşimi ile açıklanmaktadır. Yapılarının polar oluşu nedeniyle bakteri hücrelerine ancak aktif transportla girebilirler. Bu enerji gerektiren bir olaydır ve bu yüzden ancak aerobik koşullarda etkili olabilirler. İrin varlığında, düşük pH değerlerinde ve Ca, Mg iyonları varlığında etkinlikleri hızla azalır.

Çoğu Gram (-) aerobik çomaklara karşı etkilidirler. Enterobacteriaceae ailesi, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* cinsi bakteriler değişen oranlarda aminoglikozidlere duyarlıdır. *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* ise genelde aminoglikozidlere dirençlidir. Gram pozitiflere etkinlikleri daha kısıtlı da olsa stafilocok, streptokok, *Listeria spp.* ve enterokok enfeksiyonlarında kombinasyonlarda etkili bulunmuşlardır.

Pseudomonas aeruginosa'nın etken olduğu ciddi enfeksiyonlarda mutlaka tedaviye eklenmeleri gerekir. Gentamisin ciddi MRSA enfeksiyonlarında vankomisin ile ciddi enterokok enfeksiyonlarında (sepsis, endokardit) ampicilin ya da vankomisin ile kombine olarak kullanılabilirler. Diğer Gram (+) enfeksiyonlarda kombinasyonlarda tercih edilmesi gereken ajan gentamisindir.

Aminoglikozidlerin güvenli kullanılabileceği aralık çok dardır ve kullanımlarındaki en önemli kısıtlayıcı özellik toksisiteleridir. En sık nefrotoksisite ve ototoksisite, nöromusküler blokaj meydana gelir. Nefrotoksisite tüm aminoglikozidlerde gelişebilen ve aminoglikozid kullanımında %5-10 oranında saptanabilen bir yan etkidir. Ototoksisite (vestibüler ya da işitsel) geri dönüşümsüzdür. Aminoglikozid tedavisi sırasında kreatinin 2-3 günde bir izlenmeli sonra hastanın özelliklerine göre izlem yapılmalıdır.

2.6.3 TEİKOPLANİN

Teikoplanin, glikopeptid yapısında bir antibiyotik olup 6 temel bileşenden oluşan kompleks bir molekül yapısına sahiptir. Gram pozitif mikroorganizmaların neden olduğu cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları, bakteriyemi, enfektif endokardit, katater, kemik ve eklem enfeksiyonları tedavisinde kullanılmaktadır. Teikoplanin, güvenliği ve etkinliği açısından vankomisine alternatif bir antibiyotik olarak gösterilmektedir (90,93).

Hem yapı hem de antimikrobiyal aktivite yönünden vankomisine benzeyen teikoplanin, duyarlı mikroorganizmaların hücre duvarı biyosentezinde peptidoglikan tabakasının polimerizasyonunun inhibisyonu ile hücre duvarı oluşumunu engelleyerek etkisini göstermektedir. Teikoplanin klinikte gram pozitif mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Teikoplanin klinikte, enfeksiyona bağlı olarak genellikle i. v veya i.m. yolla ve başlangıç dozu olarak 400 mg, devamında her gün 200 veya 400 mg dozda uygulanmaktadır. Böbreklerden atıldığı için böbrek hastalığı olanlarda kullanım dozu farklıdır. Terapötik dozlarda vankomisine göre daha iyi tolere edilebilen bir antibiyotik olup nörotoksik ve nefrotoksik değildir (90-93).

Teikoplanin, bakterilerin hücre duvarında bulunan muramilpentapeptidin *amino* açıl-D-alanil-D-alanin grubuyla etkileşerek transglikolizasyon reaksiyonunun oluşmasını engeller ve hücre duvarı sentezini inhibe ederek etkisini gösterir (91-92).

Teikoplanin'in vankomisine göre daha lipofilik özellikte olması, onun bakteri duvarından penetrasyonunu daha iyi bir şekilde sağlamaktadır (90).

Ancak sözü edilen her iki maddenin antimikrobiyal etki şiddeti farklıdır. Teikoplanin genellikle streptokoklara ve gram pozitif anaeroblara karşı vankomisinden daha etkili iken koagülaz negatif stafilokokların bazı türlerine karşı da vankomisinin daha etkili olduğu bulunmuştur. Buna karşılık her iki antimikrobiyal maddenin de *Staph. aureus* türlerine

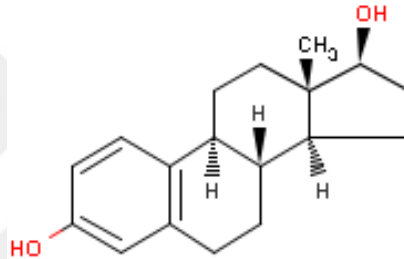
(metisiline dirençli) karşı benzer etki gösterdiği bildirilmektedir. Teikoplanin'in metisiline hassas ve metisiline dirençli olan her iki *Staph. aureus* türüne karşı in vitro etkinliğinin iyi olduğu gösterilmiştir (94).

2.7 ÖSTROJENİN KEMİK ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

2.7.1 ÖSTROJEN

Östrojen vücutta büyüme, farklılaşma, metabolizma ve üreme gibi fonksiyonlar üzerinde etkisi olan 18 karbonlu steroid yapıda bir hormondur. Gebelik dışında kadınlarda büyük oranda overlerden, küçük bir oranda ise adrenal korteksten salgılanmaktadır. Gebelik sürecinde ise büyük oranda plasentadan salgılanır.

Görsel 9: 17 β -östradiolün kimyasal yapısı



Kanda üç tip östrojen bulunmaktadır (95):

- Östron
- 17 β -östradiol
- Östriol

Salgılanan başlıca östrojen olan 17 β -östradiol, dolaşımda östron ile denge halindedir. Östron, daha sonra östriole metabolize olur. Bu dönüşümün büyük bir kısmı karaciğerde gerçekleşir. Bu üç östrojen içinde etkisi en potent olanı 17 β -östradiol, en zayıf olanı ise östrioldür. Dolaşımdaki östradiolün %2'si serbesttir. Kalanı ise %60'ı albümine, %38'i testosteronu da bağlayan seks steroid-bağlayıcı globuline olmak üzere proteinlere bağlıdır (96).

Östrojenin kemik üzerindeki temel görevi kemik yoğunluğunun korunması ve kemik dokuyu osteoporoza karşı korunmaktır. Menopoz sonrasında overlerden premenapozal dönemde salgılanan östrojenin artık hemen hiç salgılanmamaktadır. Postmenopozal dönemdeki kadınlarda ortaya çıkan bu östrojen eksikliği osteoporoza yol açmaktadır. Bu

dönemde osteoblastik aktivite azalırken osteoklastik aktivitede artış meydana gelir ve fonksiyonel yaşam süresinin osteoklast için uzaması ve osteoblast için kısalması sonucu kemik yıkım–yapım dengesinin yıkım lehine bozulur. Bunun sonucunda osteoporoz ve kemik kırıkları gibi patolojilerle seyreden klinik tablo ortaya çıkmaktadır (97).

2.7.2. ÖSTROJEN RESEPTÖRLERİ

Östrojen hormonu yukarıda bahsedilen fonksiyonlarını bağlandığı reseptörü yoluyla (ER) gerçekleştirir. Östrojen reseptörü ligand bağımlı transkripsiyon faktörlerinin süper ailesine dâhil olup hücre nükleusunda yer alan bir hormon reseptörüdür. Bugüne kadar ER α ve ER β olmak üzere 2 çeşit reseptör tanımlanmıştır (98). ER α , 66 kDa moleküler ağırlıkta olup, 595 amino asit içerir. ER β ise ER α 'dan daha kısa olup, 54 kDa moleküler ağırlıkta ve 530 amino asitten oluşur (99).

Östrojen reseptörü ile hücrel değişiklikleri kontrol eder indükler. Östrojenin etkisini gösterdiği klasik mekanizmada östrojen steroid yapıda olup lipofilik bir molekül olduğu için kolaylıkla hedef hücreye diffüze olur ve nükleusta lokalize ER` ye bağlanır. Bu bağlanma, reseptörde konformasyonel bir değişikliği uyarır ve östrojen yokluğunda hsp90 şaperonlarına bağlı haldeki reseptörün hsp90'dan ayrılmasını sağlayarak reseptör dimerlerinin oluşumunu sağlar. Meydana gelen östrojen–ER kompleksi; reseptörün DNA'ya bağlanan domaini aracılığıyla ya koaktivator ya da korepresör proteinlerle birlikte hedef genin promotor ve/veya enhancer bölgelerinde yer alan gen dizilerine bağlanır. Sonuçta bazen hedef genin transkripsiyonu uyarılır, bazen de inhibe edilir ve ilgili protein konsantrasyonu hücrenin ihtiyacına göre düzenlenmiş olur (100).

Östrojen reseptörleri kemik doku dışında merkezi sinir sistemi, kardiyovasküler sistem, immün sistem, ürogenital sistem, sindirim sistemi, böbrekler, karaciğer, akciğerler ve meme dokusu (101) gibi birçok organda ve güncel çalışmalar göstermiştir ki embriyonik ve mezenkimal kök hücrelerde eksprese olmaktadır (102).

2.7.3. ÖSTROJENİN KÖK HÜCRELER ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Güncel çalışmalar ile östrojen reseptörlerinin kök hücrelerde de eksprese olduğunun gösterilmesiyle östrojenin kök hücre fonksiyonlarını modifiye edebileceği düşünülmektedir (103).

Hamada ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri çalışmaya göre 17 β -östradiol endotelial progenitör hücrelerin hasarlı damar ve iskemik myokardial dokulara migrasyon ve proliferasyonu tetikleyerek rejenerasyona katkıda bulunmaktadır (104).

Embriyo ve embriyonik kök hücrelerde embriyolojik hayatın ilk günlerinden itibaren ER α ve ER β 'nın eksprese olması östrojenin insan embriyonik kök hücresinin proliferasyonu ve farklılaşmasında etkili olduğunu düşündürmektedir (103). Han ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri çalışmada embriyonik kök hücrelerinde 17 β -östradiol etkisiyle nükleik asit yapısına 3-H timidine katılımının artmasıyla DNA sentezinin uyarıldığı, tam tersine ER blokörü olan tamoksifen kullanımıyla inhibe olduğu gösterilmiştir. Östrojen etkisiyle ER ekspresyonu ve c-fos, c-jun ve c-myc gibi protoonkogenlerin mRNA ekspresyonu artmaktadır (105).

MSC'ler bakımından konsept değerlendirildiğinde ER reseptörlerinin bu hücrelerde de eksprese olmasından dolayı östrojen etkisinde sitokin ve büyüme faktörlerinin uyarılması sonucunda proliferasyon ve farklılaşmanın uyarılacağı düşünülmektedir.

Östrojenin MSC'lerin üzerine bir başka etkisinin de kemik seriyeye farklılaşmaları yönündedir. 17 β -östradiolün MSC'leri osteoblastik aktivite yönünde daha çok ER α üzerinden uyardığı düşünülmektedir (106). Kemik iliğinden türetilmiş MSC'ler 17 β -östradiol ile beraber osteojenik farklılaşma ortamına maruz bırakıldıklarında kemik morfojenik protein (BMP) ve osteokalsin ekspresyonunun, ekstrasellüler matriks mineralizasyonunun anlamlı olarak arttığı görülmüştür. 17 β -östradiolün ayrıca MSC'lerin osteojenik genler olan ALP, kollajen tip 1 ve TGF- β 1 ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (102).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tezde konu edilen, deneysel çalışma olup İstanbul Mehmet Akif Ersoy Deneysel Araştırma, Geliştirme ve Eğitim Merkezi'nde (IDEA Laboratuvarı), 23.03.2018 tarihinde yapılan, 2018/06 sayılı Deney Hayvanları Etik Kurul onayı alınarak yapılmıştır.

Son yıllarda indüklenmiş membran çalışmalarına artan ilgi ve açıklanan umut vadeden sonuçlar, özellikle travma – deformite ile ilgilenen birçok cerrah gibi bizi de tekniği modifiye ederek oluşacak indüklenmiş membranın kalitesini artırma ve/veya oluşum süresini kısaltma, ameliyat sonrası kaynamama ve enfekte olma gibi komplikasyonları yenme duygusuyla çalışma planlamaya itti.

3.1. DENEY HAYVANLARI VE ÇALIŞMA GRUPLARI

Buradan hareketle toplam 6 alt gruptan oluşmak üzere her grupta en az 7 şerden toplam 42 rat ile deneysel modelimizi planladık. Wistar Hannover cinsi, erkek ratlar ortalama 10-12 aylık ve 300-350 gram ağırlığında olacak şekilde çalışmada kullanıldı.

İlk grubumuz kontrol grubu yani yalın sement (PMMA - K) şeklinde adlandırıldı. Bunun dışında orijinal teknikte tarif edilenin aksine; Teikoplanin katkılı PMMA (T grubu), gentamisin katkılı (G grubu), fusidik asit katkılı PMMA (F grubu) olmak üzere 3 adet antibiyotik katkılı grup oluşturularak, kontrol grubuyla antibiyotiklerin etkilerini karşılaştırmayı amaçlayan gruplarımız çalışıldı.

Ayrıca östrojenin osteoblastik etkilerinin lokal uygulamadaki etkilerini gözlemlemek amacıyla estradiol katkılı grup (E grubu) oluşturuldu.

Son olarak, model oluşturulurken yapılan kemik osteotomisi ile çıkarılan femur diafiz parçalarının küçültülerek karıştırılan kemik çimentoya eklenmesiyle oluşturulan kemik grefti (BC grubu) medulla ve korteksten salınacak kemik öncül hücreler, mediyatörler ve faktörlerin lokal etkisini gözlemleyebilmek adına planlandı.

Yukarıda bahsedildiği gibi bir tanesi kontrol olmak üzere 6 grup oluşturuldu. K (kontrol), G (gentamisin), T (teikoplanin), F (fusidik asit), E (östrojen) ve BC (otojen greft) harfleri ile isimlendirilen her grup için, yapılan güç analizinde gösterildiği gibi, 7 hayvan çalışmaya dâhil edildi. Kemik afinitesi yüksek, termostabil özlükleri bilinen ve Staf. Aureus gibi ortopedik pratikte en sık görülen enfeksiyonlara karşı etkiliği yüksek T, F ve G grupları oluşturuldu.

Farklı çalışmalarda iki basamaklı prosedürün zamanlaması ile ilgili çeşitli yaklaşımlar olmakla beraber Nau ve arkadaşlarının ve Henrich ve arkadaşlarının çalışmalarında, 4-6. haftalar arasında ikinci basamak işlemin uygulanabileceği ifade edilmektedir (3,4)

Örnek alımı ve sakrifikasyon işlemi için ameliyat sonrası için Henrich ve arkadaşlarının çalışmalarında gösterdikleri üzere İM aktivitesinin maksimuma çıktığı 4. Hafta planlandı.

Grup Numarası	Grup Sembolü	Açıklama	Kullanılan Rat Adedi	Sakrifikasyon Tarihi
Kontrol -1	K	Katkısız/yalın sement kullanılan grup	7 adet	4. hafta
2. Grup	T	Teikoplanin katkılı sement kullanılan grup	7 adet	4. hafta
3. Grup	G	Gentamisin katkılı sement kullanılan grup	7 adet	4. hafta
4. Grup	F	Fusidik asit katkılı sement kullanılan grup	7 adet	4. hafta
5. Grup	E	Östrojen katkılı sement kullanılan grup	7 adet	4. hafta
6. Grup	BC	Otojen femur diyafiz parçaları kemik çimentoya eklenen grup	7 adet	4. hafta

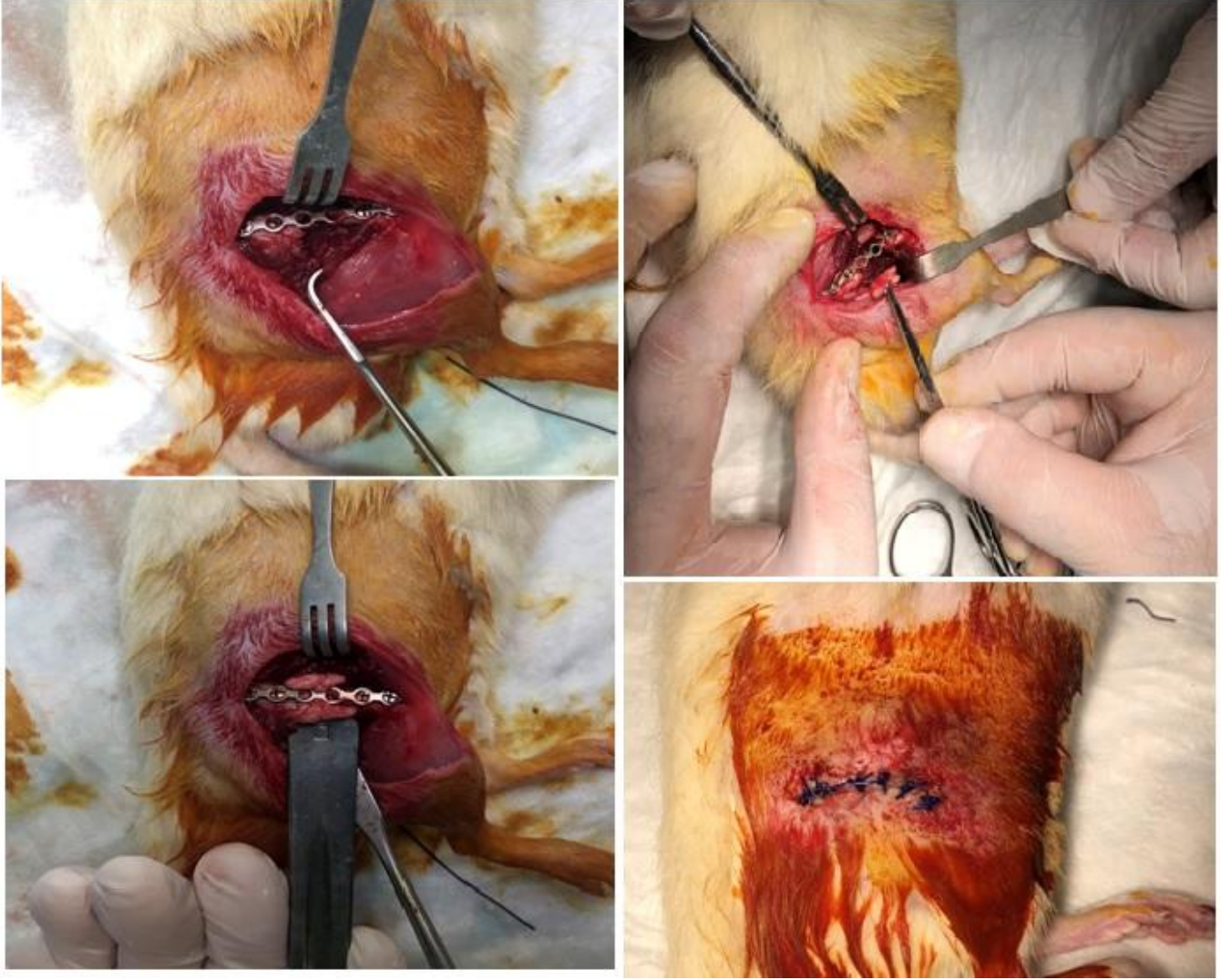
Tablo 1: Çalışma grupları, hayvan sayıları ve sakrifikasyon tarihleri

3.2. HAZIRLIK VE AMELİYAT

Anestezi hazırlığı sonrasında uygun tıraş ve steril boyama ve örtme işlemleri uygulandı. Her hayvan için sağ uyluktan yapılan insizyonu takiben, quadriseps kasının rektus femoris ve vastus lateralis başları arasından künt geçilerek girişim yapıldı. Femur kemiği ortaya konduktan sonra 6 delikli bir plak 2 proksimal ve 2 adet de distal vida olacak şekilde implante edildi. Plak ortasındaki 2 delikten mikro oyucular yardımıyla yapılan osteotomi ile yaklaşık 10 mm femur diyafiz defekti oluşturuldu. Her rat için ayrı olacak şekilde her grup için daha önce belirlenen ölçüde, elektronik terazi yardımıyla ve steril şartlarda kemik çimento karıldı ve defekt bölgesine yerleştirildi. Yıkama sonrasında cilt altı dokular ve kaslar eriyebilen, cilt ise propylen sütür materyali ile onarıldı. Anestezi etkisindeyken iki yönlü grafiler çekildi.



Görsel 10: Ameliyat masası, rat rektal probu vücut sıcaklık sabitleyici takılmış vaziyette.



Görsel 11: Sırasıyla sol üst köşede köprü plaklama uygulama sonrasında oluşturulan KBD, sağ üst köşede çıkarılan segmentin görüntüsü, sol alt köşede PMMA + T grubuna ait teikoplanin katkıli kemik çimentonun defekt bölgesine uygulanışı ve sağ alt köşedeki son görselde işlem sonrası cildin onarılmış görüntüsü ile kesinin boyutu ve lokalizasyonun değerlendirilmesi.

3.3. MODİFİYE EDİLEN KEMİK ÇİMENTONUN HAZIRLANIŞI VE UYGULANMASI

Osteotomi işlemini standardize edebilmek amacıyla, cilt ve cilt altı kesisi ve kas dokuların künt olarak geçilmesi sonrasında; 6 delikli plaklara 2 adet proksimal ve 2 adet de distale olacak şekilde vidalama işlemi yapıldı. Kullanılan plaklar kranio-maksillo-fasyal cerrahide kullanılan 1,5 mm kalınlığındaydı ve 300-350g rat femuruna tam uyum gösteriyordu. Ortada kalan 2 adet vida yuvasının ince bir K teli ile oyulması sonrasında klemp yardımıyla osteotomize edildi. Bu her seferinde 1-2 mm hata payı ile ortalama 10 mm bir defekt anlamına geliyordu. Aynı anda işlemi asiste eden kişi, hassas terazi ile karma işleminin yapılacağı kabın ağırlığını da hesaba katarak ölçüm yaptı, steril şartlarda, her rat için ayrı sement kardı. Sıvı polimerin eklenmesi sonrasında 30 saniye kadar karıştırıldı. Uygun kıvama geldiği görülünce, defektif bölgeye uygulandı ve steril mini ekartörler ile femur ile uyumlu olacak şekilde biçimlendirildiler, çimento kuruyunca yumuşak dokular kontrol edildi ve fazlalıklar temizlendi. Yıkama işlemini takiben kaslara eriyebilen yaklaştırma sütürleri uygulandı. Ardından cilt erimeyen sütür ile onarılıp pansuman yapıldı (Görsel 13). Kemik çimentolama işlemi, **VERSABOND - Smith & Nephew** ile yapıldı.

Kemik çimentolar, her rat için ayrı olacak şekilde, çok küçük miktarlardaki sementin karıştırılması ve uygulanması esnasında meydana gelebilecek kayıpların telafi edilebilmesi amacıyla katı polimer, sıvı monomer ve eklenecek ajanların daha önceden hesaplanan uygulama oranlarına sadık kalınarak hazırlandı.

Yalın PMMA – K alt grubunun çimentolama işlemleri esnasında, antibiyotik katkısız yalın sement, rat başına yaklaşık 0,2-0,3 g düşecek şekilde uygulandı.

Gentamisin katkılı PMMA – G alt grubunun çimentolama işlemi esnasında, 40g PMMA içerisinde 1g gentamisin olacak şekilde, rutin kullanımdaki şekliyle kemik çimento hazırlandı. Yine rat başına yaklaşık 0,2-0,3 g olacak şekilde, sabit oranda hazırlandı. Bu grup için yine aynı markanın, hazır gentamisin katkılı sementi kullanıldı (**VERSABOND AB-Smith & Nephew**).

Teikoplanin katkılı PMMA – T alt grubunun çimentolama işlemi esnasında, 40g PMMA içerisine 800 mg olacak şekilde (2 flakon Tekosit® 400 mg) toz halde eklendi. Steril bir karıştırıcı ile önce topaklanmalar önlenerek ezildi, ardından hassas terazide sabit oranları korunarak monomer sıvı eklendi ve her rat için aynı işlem tekrarlandı. Bazı çalışmalar teikoplaninin mekanik yorulma dayanımının 40g çimento için 2g'a kadar gösterse de (107),

çeşitli çalışmalar yapılmış olup 800 mg üzerindeki miktarların yorulma dayanımını önemli ölçüde azalttığını göstermiştir (108).



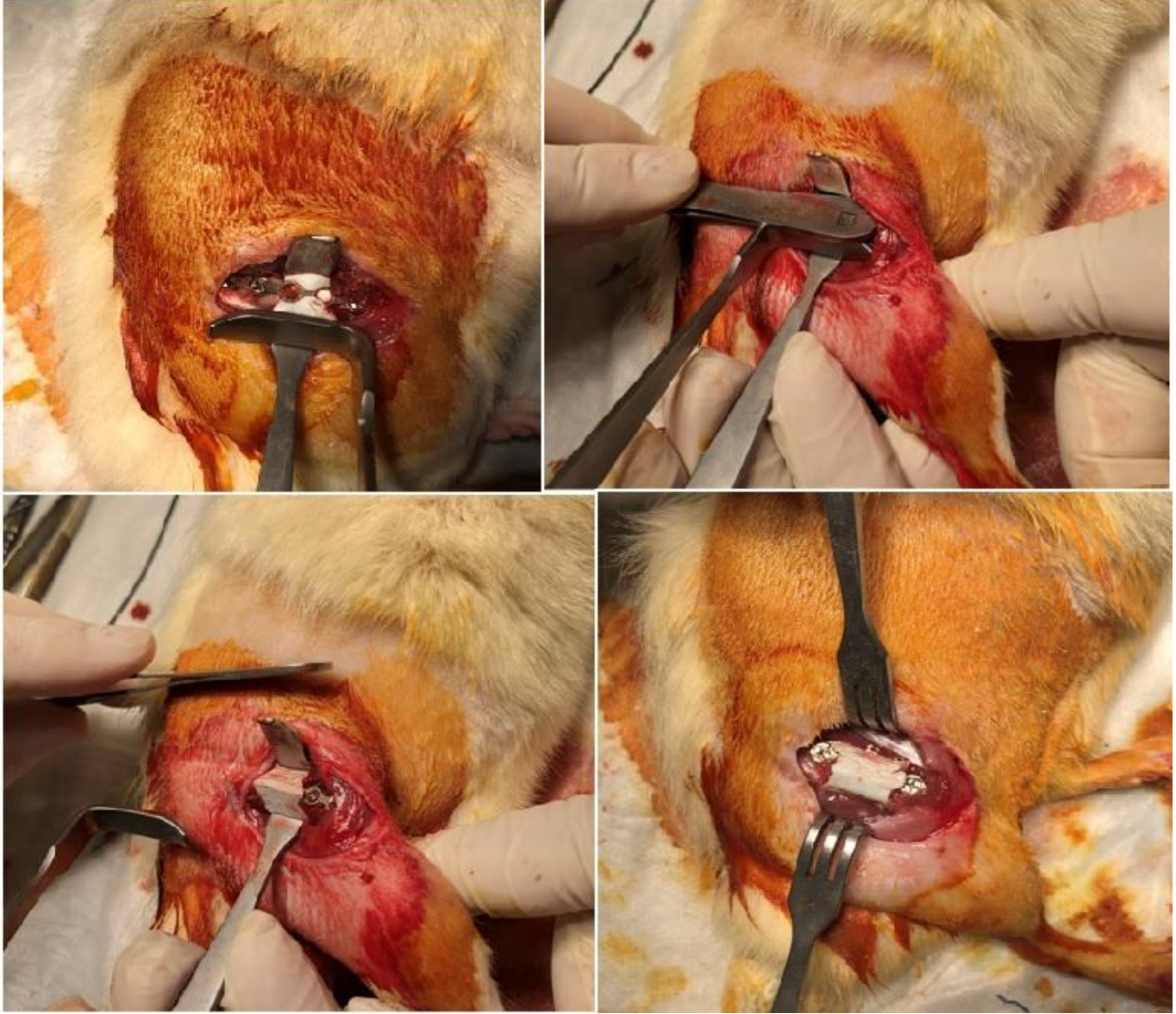
Görsel 12: Elektronik tarıta belirlenen miktarda kemik çimentonun steril şartlarda hazırlanışı

Fusidik asit katkılı PMMA – F alt grubunun çimentolama işlemi esnasında, 40g PMMA içerisine 1 g olacak şekilde (2 flakon Stafine® 500 mg – Sodyum Fusidat) toz halde eklendi. Steril bir karıştırıcı ile önce topaklanmalar önlenerek ezildi, ardından hassas terazide sabit oranları korunarak monomer sıvı eklendi ve her rat için aynı işlem tekrarlandı. Fusidik asit ile ilgili çok az sayıda makale olmakla birlikte, 40 g PMMA içerisine, bir grupta 0,5 g gentamisin + 0,5 g fusidik asit ve diğer gruba ise 1 g gentamisin + 1 g fusidik asit eklenmiştir (109). Fakat izole olarak fusidik asit eklemiş kemik çimentosu bulunan bir yazı bulunmamakla birlikte, bir takım in vitro çalışmalarda 10 g spacer’a 250 mg olacak şekilde tanımlamalar vardır. Bu da bizim yaptığımız 40 g çimentoya 1 g FA oranına uygundur.

Östroje katkılı PMMA – E alt grubunun çimentolama işlemi için her seferinde 0,2-0,3 g PMMA içerisine, 2 mg (0,002 g) estradiol (Estrofem® 2mg tablet – Estradiol hemihidrat) bulunan 1 tablet homojen bir şekilde parçalanarak eklendi. Literatürde östrojen türevlerinin kemik çimentoya eklenerek lokal etkisinden faydalanan bir yayın bulunmamaktadır.

Otojen greft katkılı PMMA – BC alt grubun çimentolama işleminde, femur osteotomisi sonucunda ortaya çıkan femur diyafiz parçacıkların, steril olarak, çok daha küçük parçalara ayrıldı ve bütünlük ve dayanımı azaltmayacak şekilde kemik çimentoya eklendi.

Kansellöz otogreftlere göre, mezenkimal kök hücre ve büyüme faktörleri açısından daha fakir olup, osteojenik potansiyeli daha düşük olsa da, KBD bölgesini dolduran kemik çimento üzerinde oluşacak İM oluşumunu olumlu yönde etkilemesi düşünüldü (110).

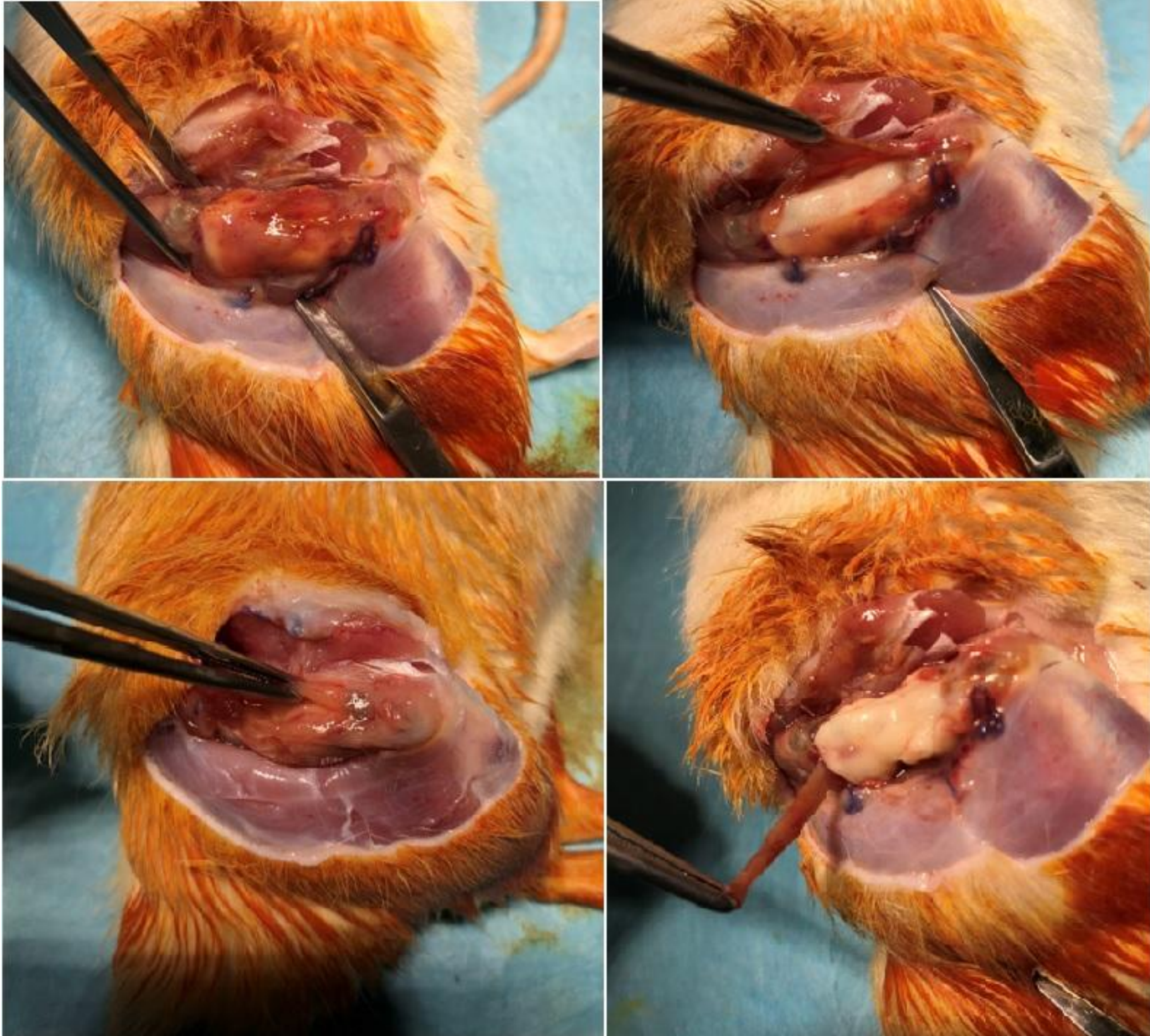


Görsel 13: Uygun dozda, steril şartlarda hazırlanan PMMA + Fusidik asit katkılı sementin, köprüleme şeklinde uygulanan plak vida sistemi sonrasında oluşturulan defekt bölgesine uygulanaşı.

3.4. DENEY HAYVANLARININ SAKRİFİYE EDİLMESİ

Deneklere ketamin-ksilazin anestezisi uygulandıktan sonra radyolojik değerlendirme için sağ femur ön-arka grafileri çekildi. Biyokimyasal çalışma için intrakardiyak 3 mL kan alındıktan sonra yüksek doz anestezik infüzyonu ile tüm ratlar sakrifiye edildi.

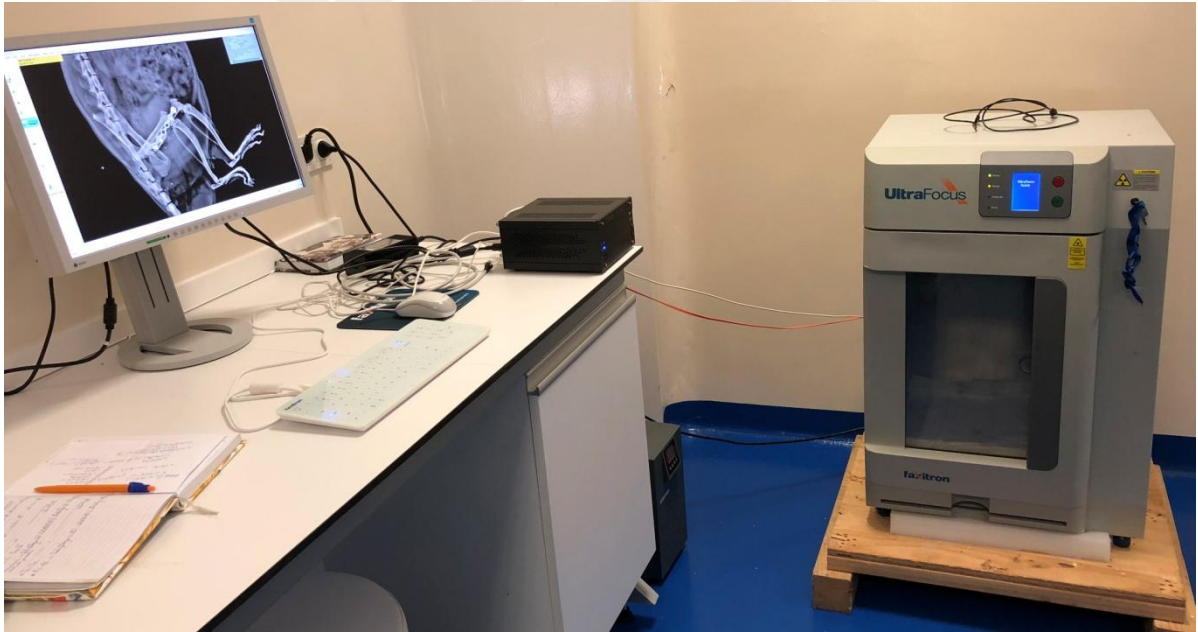
Sakrifikasyon sonrası tüm deneklerin sağ femurlarından eski insizyon skarlarından girildi. Katlar geçildikten sonra oluşan İM bistüri yardımıyla keslip sıyrılarak % 10 formalin içinde histopatolojik çalışma için ayrıldı.



Görsel 14: Sakrifikasyon işlemi sonrasında PMMA + E (östrojen) grubuna ait bir ratın, 4. hafta sonucu oluşan İM görüntüsü.

3.5. RADYOLOJİK İNCELEME

Direkt grafi, uygulaması ve değerlendirilmesi kolay olan noninvaziv, basit bir yöntemdir. Kemğin kaynaması veya kırık iyileşmesinin değerlendirilmesinde belirli bir standart oluşturmak için otörler tarafından skrolama sistemleri geliştirilmiştir. Bunlardan biri de goldberg radyolojik skrolama sistemidir. Çalışmamızda hemen ameliyat sonrası, anestezi etkisi altında 2 yönlü grafler çekildi. Dört hafta sonra sakrifikasyon amacıyla anestetik uygulanan ratlara, işlem öncesi yine 2 yönlü grafler çekildi. Görüntülemeler Mehmet Akif Ersoy Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi İDEA Deney Hayvanları Laboratuvarında, **The UltraFocus digital x-ray cabinet by Faxitron®** cihazıyla yapılmıştır. Çalışma sonrası tüm ratların görüntüleri iki farklı gözlemi tarafından incelendi ve Goldberg sınıflama sistemine göre değerlendirildi (111). Ancak bizim çalışmamızdaki temel amaç, İM erken histopatolojik ve immunohistokimyasal değerlendirmesi olduğundan, sakrifikasyon zamanını 4. hafta olarak belirlemiştik. Bu sebeple kemikleşmenin erken safhalarındaki radyografik görüntüler arasında anlamlı bir fark bulunmadı.



Görsel 15: Görüntülemelerin yapıldığı cihaz ve ekranda PMMA + G grubundan bir rat görüntüsü.

Derece 0	Radyolojik kaynamama
Derece 1	Muhtemel kaynama
Derece 2	Radyolojik kaynama

Tablo 2: Goldberg sınıflaması

3.6. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

3.6.1 İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELEME:

Doku örneklerinde, hücre ve doku antijenlerini göstermek amacı ile, işaretlenmiş monoklonal ve ya poliklonal antikorlar kullanılarak Streptavidin-Biotin-Peroksidaz yöntemi ile immünohistokimyasal boyama uygulandı. Bu işlem için ışık mikroskopik incelemelerde kullanılmak üzere hazırlanan parafin bloklardan, 3-5 µm kalınlığında, adeziv lamalar üzerine alınacak olan parafin kesitler, 37°C etüvde 1 gece süreyle bekletildi. Kesitlerin toluolde deparafinize edilmesinin ardından, yükselen alkol serilerinden geçirilerek dokuların rehidratasyonu sağlandı. Isı ve/veya enzimatik yollarla doku antijenlerinin ortaya çıkarılması (antigen retrieval) işleminden sonra kesitler endojen peroksidaz aktivitesinin bloke edilmesi için metanol içinde hazırlanmış %3'lük H₂O₂ çözeltisinde bekletilecektir. Kesitler, immün boyama/işaretleme için kullanacağımız hazır kit içerisindeki bloklama solüsyonunda 10 dakika bekletildi. Bu işlemten sonra bloklama solüsyonu ortamdan uzaklaştırıldı. **VEGF ve TGF-Beta** proteinlerine karşı kullanılacak olan primer antikorlar ile oda ısısında 1 saat ya da +4°C' de nemli ortamda 1 gece dokuların inkübasyonu sağlanıp, kesitlerin bu inkübasyonu takiben PBS (Phosphate buffered saline) ile yıkanması ile fazla antikorlar ortamdan uzaklaştırıldı. Dokular, 15 dakika sekonder antikorla muamele edilecek ve ardından da yine PBS ile yıkanıp 15 dakika HRP streptavidin- kompleks ile muamele edildi. Dokulardaki, streptavidin- peroksidaz aktivitesinin sağlanabilmesi için substrat olarak AEC kullanıldı. PBS ile yıkama sonrası Mayer's hematoksilin ile çekirdek boyaması yapıldı ve kesitler gliserin jel kapama solüsyonu ile kapatıldı (112-113).

3.6.2 BOYAMANIN ÖZGÜNLÜĞÜ:

Spesifik immün işaretlenmenin özgünlüğü 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 içermeyen dilüent kullanıldı. İlgili antijenlerle pozitif immün işaretlenme gösteren hücreler boyanma şiddeti ve boyanan hücre sayısı açısından semi-kantitatif olarak (boyanan hücre sayısı ile boyanma şiddetinin beraber değerlendirilip) analiz edildi. Böylece bu proteinlerin lokalizasyonları belirlenip, proteinlerin ekspresyonlarındaki değişiklikler semi-kantitatif olarak saptandı.

3.7. İSTATİKSEL YÖNTEM VE GÜÇ ANALIZI

Masquelet tekniğinde kullanılan çimento özelliklerinin ve içeriğinin farklılaştırarak daha kısa sürede daha iyi biyolojik yanıtın sağlanması ve klinik uygulamalara yol gösterilmesi amacıyla yapılan bu çalışmada 6 grup ve 7 ölçüm ile gruplar arası tek yönlü varyans analizi için power analizi G-Power programı ile $\alpha=0,05$, güç=0,080 ve klinik tecrübeye dayalı olarak belirlenen yüksek etki düzeyi ($f=0,60$) varsayımları altında hesaplanmıştır. Bu varsayımlar altında gerekli olan minimum toplam örneklem büyüklüğü 42 olarak saptanmıştır.

Histolojik verilerin istatistiksel çözümlemesi amacıyla, immunohistokimyasal değerlendirme ve skorlamaların tamamlanmasının ardından TGF-b ve VEGF ekspresyonunu değerlendirdiğimiz tablonun istatistiki olarak anlamlılığı değerlendirildi. Daha sonra benzer işlem, histopatolojik değerlendirme ve skorlamaların yapıldığı tablo için tekrarlandı. Son olarak da her iki değerlendirme arasında korelasyon olup olmadığına bakıldı.

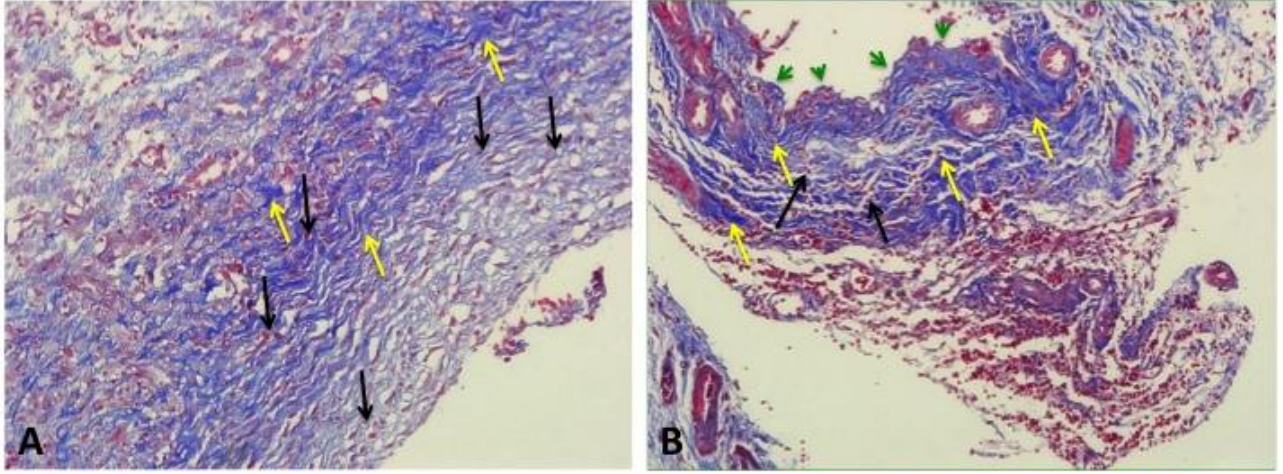
Normal dağılım varsayımını gerçekleştirmeyen değişkenlerde, ikiden fazla grup karşılaştırmalarında ise Kruskal Wallis H testi kullanıldı. Anlamlı farklılığın kaynağını tespit etmek amacıyla Bonferroni Dunn Çoklu Karşılaştırma testi kullanıldı. $P<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Analizler NCSS 11(Number Cruncher Statistical System, 2017 Statistical Software) Programı ile yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

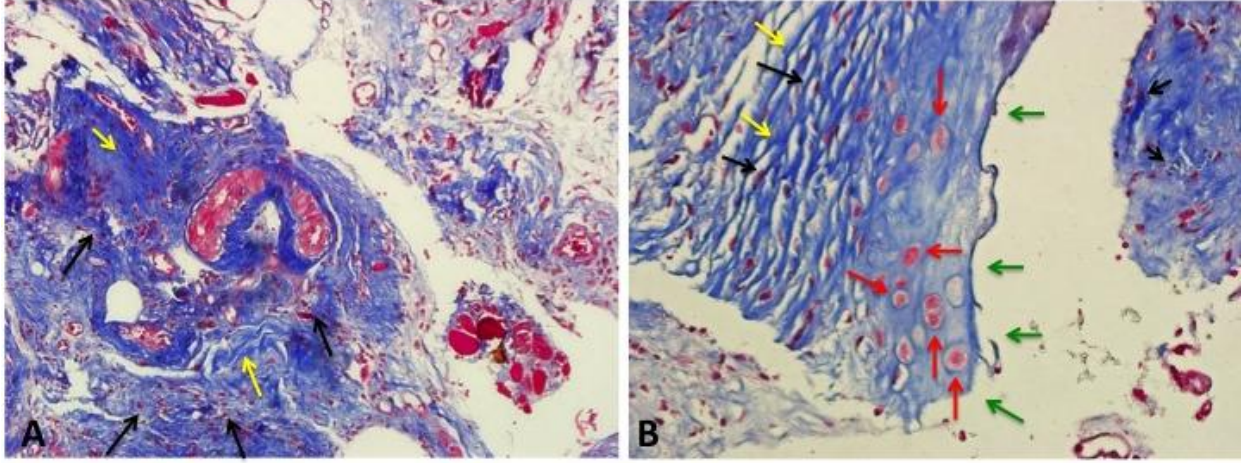
Deneklerden 4. hafta dolaylarında alınan doku örneklerinde yapılan histopatolojik inceleme sonucu, grupların tümünde, morfolojik özelliklerinden yola çıkarak, osteoblastik projenitör hücreler olduğunu düşündüğümüz, ökromatik çekirdek içeren, GER ve ribozomlardan zengin çok sayıda hücre gruplarının olduğu görüldü (Görsel 16).

Saf sement grubuna ait örneklerde projenitör hücrelerin yanı sıra, kolajen lif yoğunlaşmalarının bulunduğu alanlar ve bunların yakın komşuluğunda osteosit benzeri hücrelerin varlığı ile belirgin öncül kemikleşme alanları görüldü (Görsel 16).



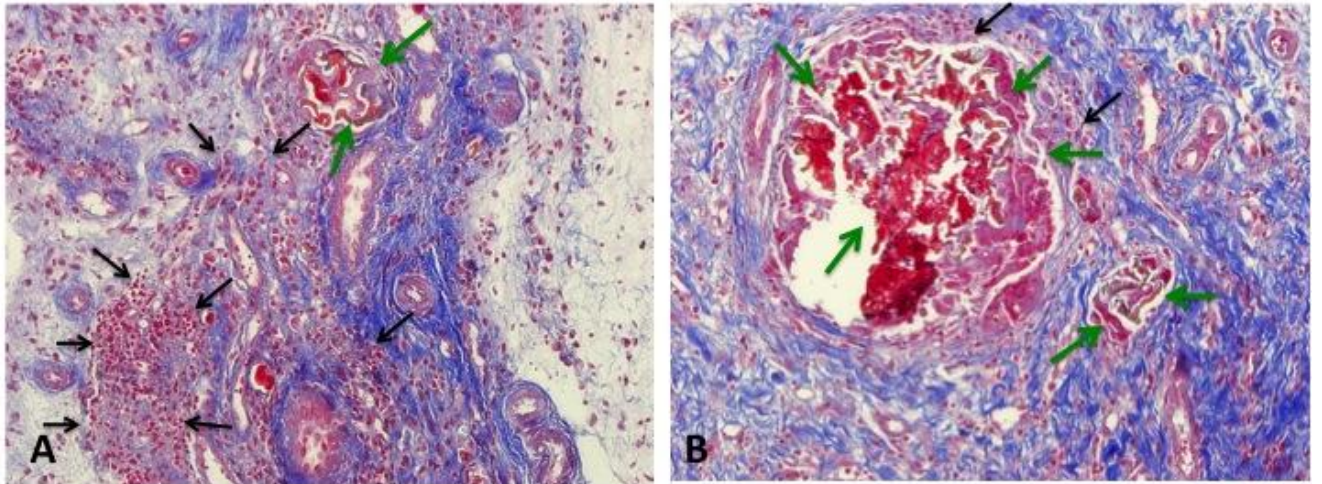
Görsel 16: K Grubu - Saf PMMA içeren grupta; genellikle ökromatik çekirdek içeren, bol stoplazmalı aktif osteoprojenitör hücreler (siyah ok) ve kollajen liflerden zengin (sarı ok) membran yapısı görülmektedir. Bununla beraber yer yer öncül kemik dokusunun (yeşil ok) oluşmaya başladığı alanlarda tespit edilmiştir. (A-B, Masson X 20)

PMMA+Gentamisin, içeren gruba ait doku örnekleri incelendiğinde projenitör hücre gruplarına ilaveten, yoğun kolajen lif kümeleşmeleri ve bunların içerisinde bulunan osteosit benzeri hücrelerin varlığı ile karakterize intramembranöz (bağ dokudan kemik dokunun modellenmesi) kemikleşme alanları tespit edildi (Görsel 17A). Yoğun projenitör hücrelerden köken aldığını düşündüğümüz kondroblastik hücrelerin varlığı da dikkat çekici idi. Kondroblastik hücrelerden zengin bu sahalar, kemik oluşum modellerinden bir diğeri olan endokondral (hiyalin kıkırdaktan kemik dokunun modellenmesi) kemikleşme alanları olarak değerlendirildi (Görsel 17B).

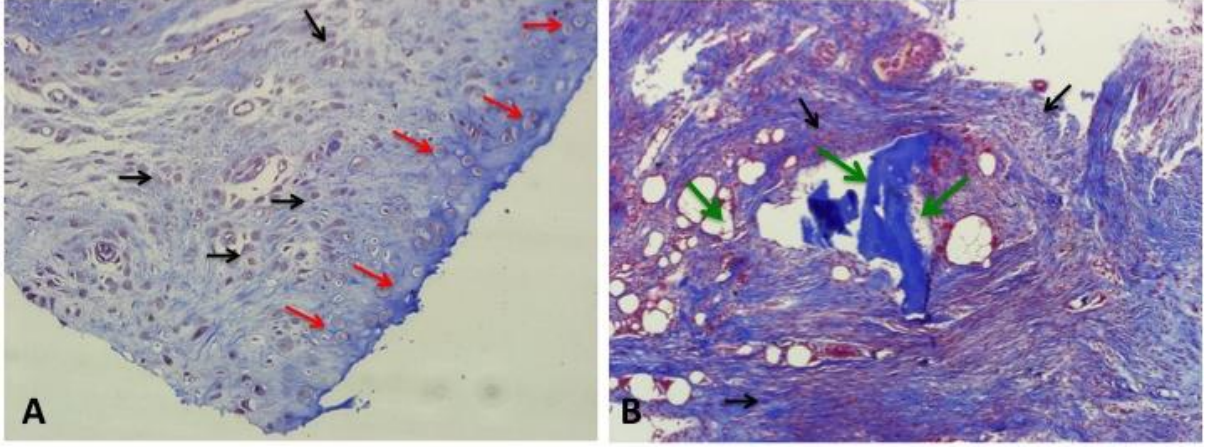


Görsel 17: G Grubu - PMMA+Gentamisin içeren grupta; oldukça yoğun kollajen lif (sarı ok) grupları içeren, aktif osteoprojenitör hücrelerden zengin (siyah ok), öncül kemikleşme sahaları görülmektedir (yeşil ok). Lakünalar içerisine oturmuş ve hatta izogen gruplar oluşturmuş kondroblastik hücre (kırmızı ok) yapıları yoğun ve dikkat çekicidir (Endokondral kemikleşme alanları) (A, Masson X 20, B, Masson X 40).

PMMA+Fusidik asit, PMMA+Teikoplanin gruplarında; PMMA+Gentamisin'li grupta bahsi geçen yapılanmalara ilaveten, küçük kemik adacıklarının varlığı tespit edildi. Bu durum beklenen kemik remodelizasyonunun oluşmaya başladığının bir göstergesi olarak kabul edildi (Görsel 18 ve 19).

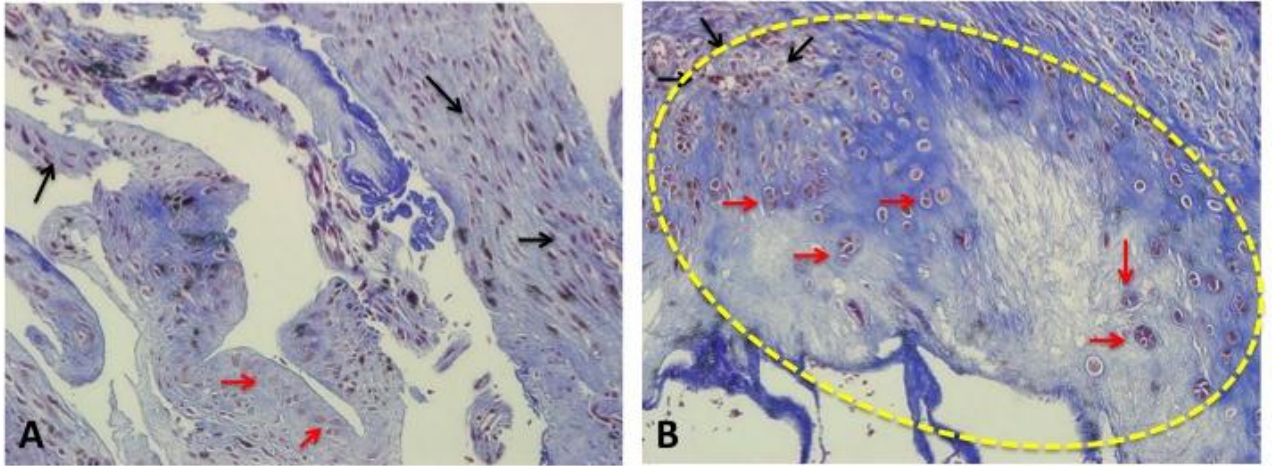


Görsel 18: F Grubu – PMMA+Fusidik asit içeren grupta; bol stoplazmalı aktif osteoprojenitör hücrelerden zengin (siyah ok) hücrelerle birlikte yeni organize olan küçük kemikleşme sahaları (yeşil ok) görülmektedir (A-B, Masson X 20).



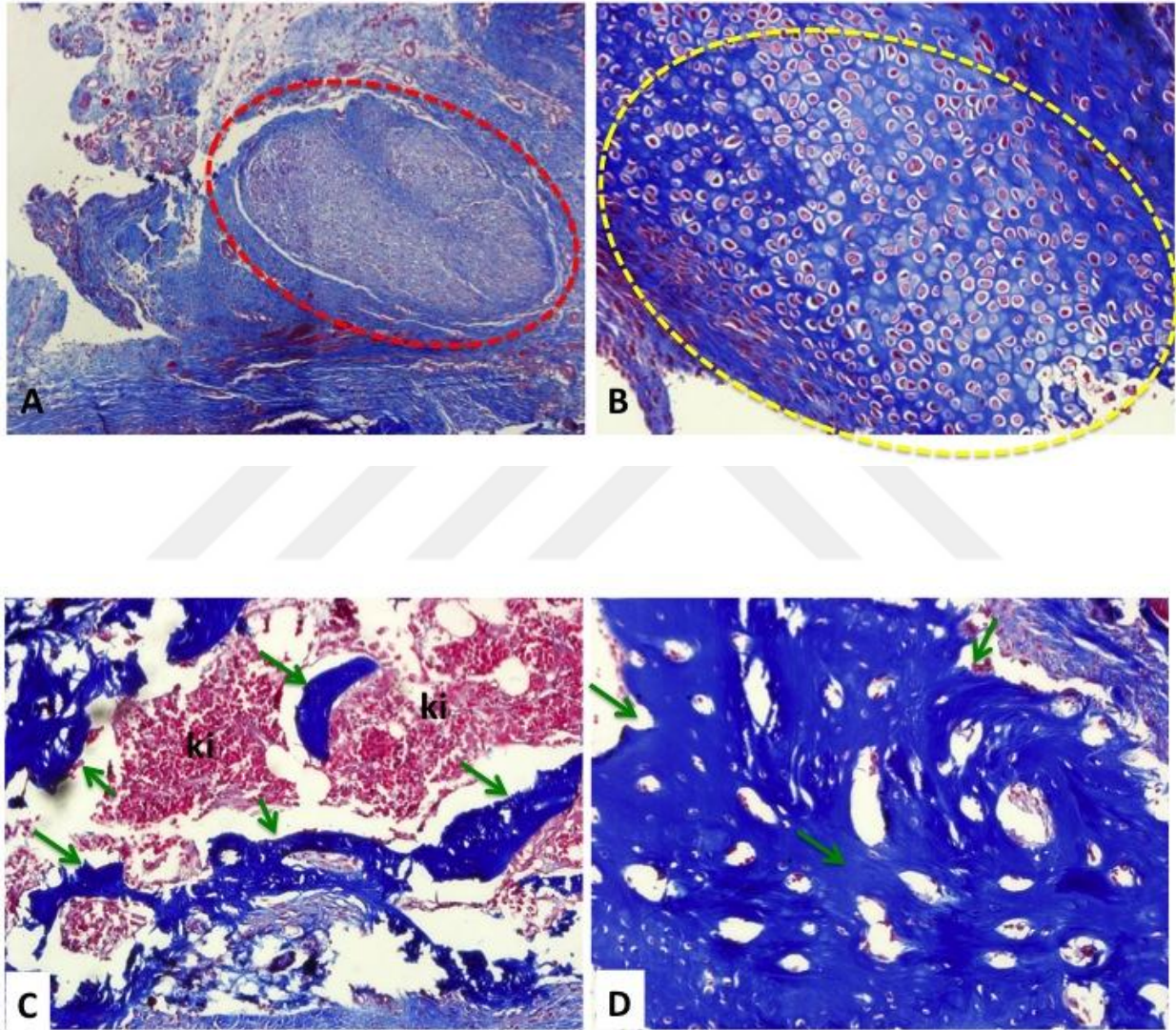
Görsel 19: T Grubu - PMMA+Teikoplanin içeren grupta; osteoprojenitör hücrelerle (siyah ok) beraber bol miktarda kondroblastik hücre (kırmızı ok) görülmektedir. Bazı gruplarda öncül kemikleşme sahaları (yeşil ok) da tespit edilmiştir (A-B, Masson X 20).

PMMA+Bone Chips içeren grupta da intramembranöz ve endokondral kemikleşme sahaları oldukça belirgindi. Kemik oluşumunda bir sonraki basamak olarak kabul edebileceğimiz matür kemikleşme sahalarına bu grupta rastlanmadı (Görsel 20).



Görsel 20: BC Grubu - PMMA+Bone Chips içeren grupta; osteoprojenitör hücrelerden zengin (siyah ok) alanların yanı sıra kondroblastlardan (kırmızı ok) zengin öncül kıkırdak alanları ve olgun kıkırdak hücrelerinden zengin endokondral kemikleşme alanları (sarı çember içerisindeki alan) görülmektedir (A-B, Masson X 20).

PMMA+Östrojen içeren grupta da Fusidik Asit ve Teikoplanin ile muamele edilen gruplardakine benzer şekilde fakat daha fazla sayıda yoğun membranöz kemikleşme ve kıkırdak sahaları görülmüştür. Ayrıca pek çok mikroskopik sahada, iyi organize olmuş, büyük matür kemik ve hatta belirgin kemik iliği sahaları dikkat çekicidir. Kemik remodelizasyonu açısından değerlendirdiğimizde, PMMA+Östrojen içeren grupta yeniden modellenmenin daha hızlı olduğu anlaşılmaktadır (Görsel 21 ve 22).



Görsel 21 ve 22: E Grubu - PMMA+Östrojen içeren grupta; yeni oluşacak kemik dokuyu şekillendirmek üzere organize olmuş yoğun membranöz kemikleşme (kırmızı çember içerisindeki alan) ve kıkırdak sahaları görülmektedir (sarı çember içerisindeki alan) (fig. A-B). Ayrıca pek çok sahada iyi organize olmuş kemik (yeşil ok) ve kemik iliği (ki) oluşumları kolayca seçilebilmektedir (fig. C-D) (A, Masson X 20, B, Masson X 40) (C-D, Masson X 40).

İmmunohistokimyasal değerlendirme ile ilgili paragrafta detaylı olarak anlatıldığı üzere, alınan tüm preperatlar ayrıca Huo ve arkadaşlarının tanımladığı histopatolojik skorlama sistemine (**Tablo 3**) göre de değerlendirilip, skorlandı (**Tablo 4**) (114).

Skor	Histolojik Bulgular
1	Fibröz doku
2	Ağırlıklı fibröz doku ve az miktarda kıkırdak doku
3	Eşit miktarda fibröz ve kıkırdak doku
4	Ağırlıklı kıkırdak ve az miktarda fibröz doku
5	Kıkırdak doku
6	Ağırlıklı kıkırdak ve az miktarda immatür kemik doku
7	Eşit miktarda kıkırdak ve immatür kemik doku
8	Ağırlıklı immatür kemik ve az miktarda kıkırdak doku
9	İmmatür kemik ile iyileşme
10	Matür kemik ile iyileşme

Tablo 3: Histopatolojik sınıflama sistemi

Gruplar	K	G	F	T	E	BC
1. RAT	2	3	4	4	5	4
2. RAT	3	4	5	7	5	5
3. RAT	3	5	7	6	7	5
4. RAT	4	5	5	5	8	4
5. RAT	3	4	6	4	9	5
6. RAT	4	6	5	6	6	6
7. RAT	3	6	7	7	8	4

Tablo 4: Her gruptaki tüm ratların, histolojik sınıflama skorlarını gösteren tablo

Histopatolojik skorlama sonuçlarını değerlendirdiğimizde, östrojen grubunun (E) en ileri diferansiyasyonu gösterdiğini görüyoruz. Neredeyse Kİ oluşum safhasına geldiğini gösteren kesitler mevcuttu. Teikoplanin (T) ve fusidik asit (F) grupları onu izledi ve yine iyi diferansiyasyon gösteriyordu. Otojen greft (BC) ve gentamisin (G) grupları da orta derecede diferansiye olmuşlardır. En gerideki grup ise yalın kemik çimento grubudur (K).

4.2. İMMUNOHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME

4.2.1 VEGF EKSPRESYONU İLE DEĞERLENDİRME

VEGF ekspresyonu değerlendirmesinde immuno reaktif skorlama (IRS) sistemi (**Tablo 5**) kullanıldı. Her alt gruptaki, her rat ayrı ayrı tecrübeli bir histopatolog tarafından değerlendirildi ve aldığı puan bir tabloya kaydedilerek, her grubun ayrı ayrı da listelenmesi sağlandı (**Tablo 6**). Değerlendirmenin tamamlanmasını ardından, aldıkları puanlara göre gruplar zayıf, orta ve kuvvetli olacak şekilde aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (**115**).

Alan yüzde skoru	Boyama yoğunluğu skoru	IRS
0 = pozitif hücre yok	0 = boyama yok	0
% 0-10 arasında	1, hafif derecede boyama	1
% 10-50 arasında	2, orta derecede boyama	2
% 50-80 arasında	3, şiddetli boyama	3
% 80> üzerinde	4, çok şiddetli boyama	4

Tablo 5: İmmunoreaktif skorlama sistemi (IRS)

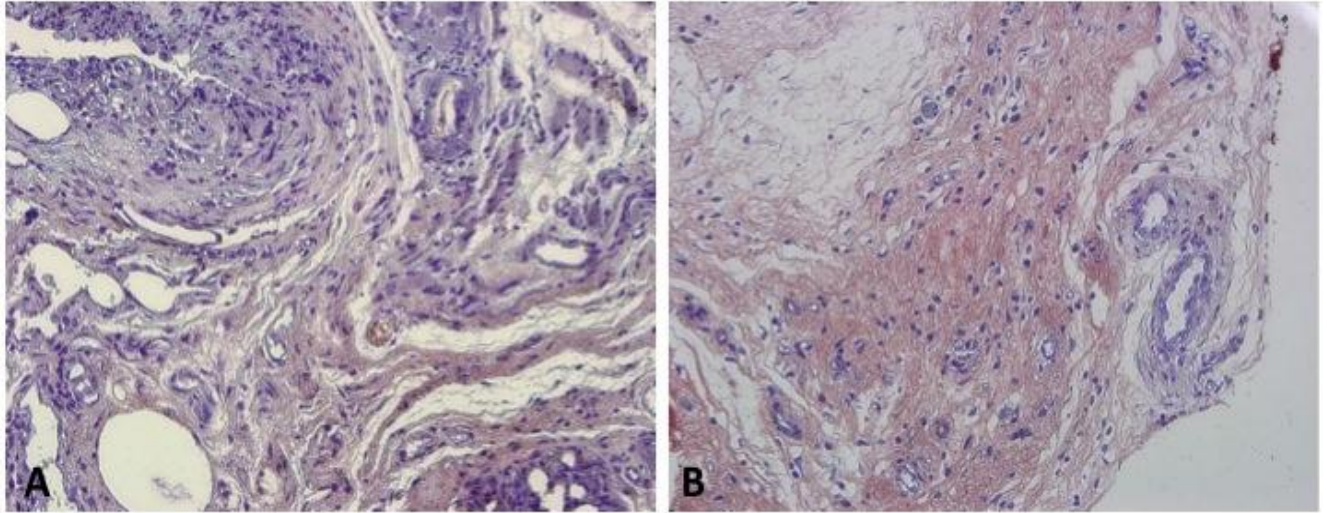
Gruplar	K	G	F	T	E	BC
1. RAT	1	2	3	2	3	0
2. RAT	1	1	1	2	4	1
3. RAT	0	2	2	3	3	1
4. RAT	0	3	1	2	4	1
5. RAT	2	2	2	1	3	0
6. RAT	1	2	2	2	2	2
7. RAT	0	2	1	2	3	2

Tablo 6: Her gruptaki tüm ratların, VEGF ekspresyonlarını gösteren tablo

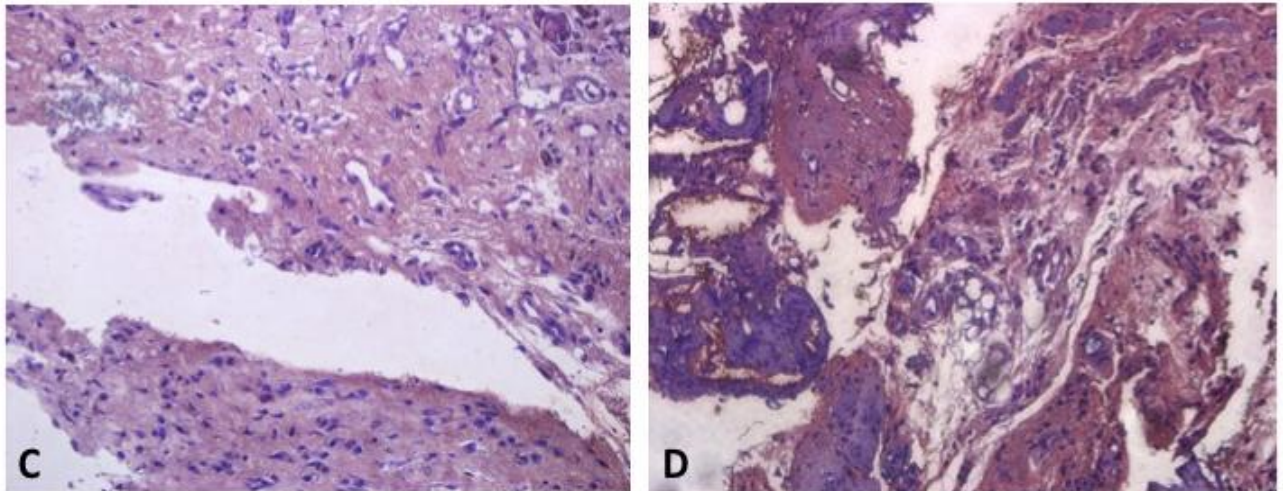
Grup Numarası	Grup Sembolü	VEFG Ekspresyonu	TGF-b Ekspresyonu
Kontrol 1 – SAF PMMA	K	ZAYIF	ZAYIF
2. Grup – TEİKOPLANİN	T	ORTA	ORTA
3. Grup – GENTAMİSİN	G	ORTA	ORTA
4. Grup – FUSİDİK ASİT	F	ORTA	Orta-Kuvvetli
5. Grup – ÖSTROJEN	E	KUVVETLİ	KUVVETLİ
6. Grup – OTOJEN GREFT	BC	ZAYIF	ZAYIF

Tablo 7: Deney gruplarına ait VEGF ve TGF-b ekspresyon seviyeleri.

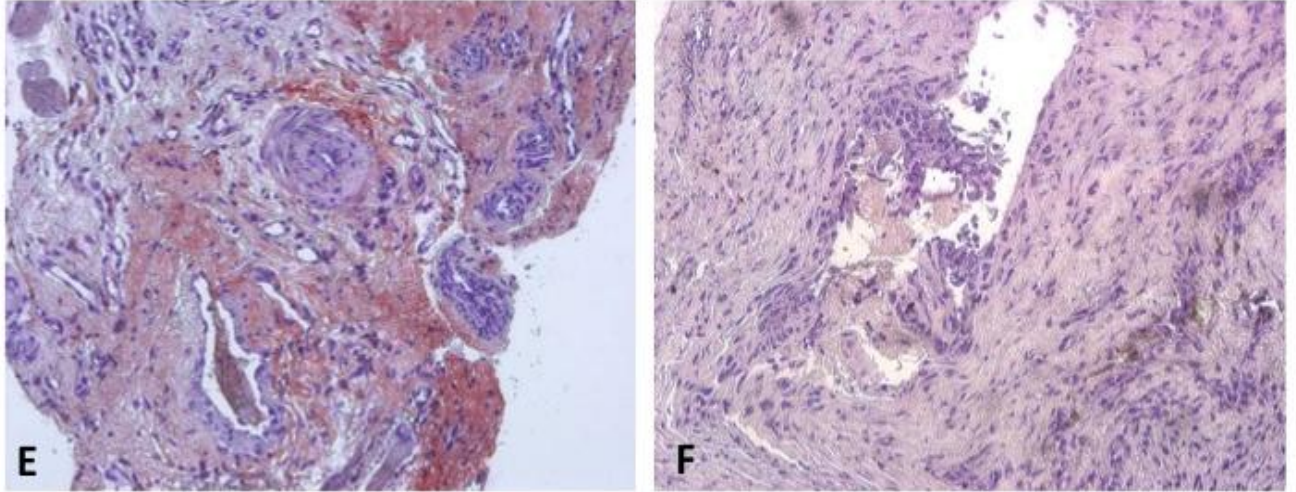
Tüm deney gruplarına ait VEGF ekspresyon seviyeleri değerlendirildiğinde, VEGF ekspresyon seviyeleri, özellikle PMMA + Gentamisin (Görsel 23B), PMMA + Fusidik (Görsel 24C), PMMA + Teikoplanin (Görsel 24D) gruplarında orta dereceli, PMMA + Östrojen grubunda kuvvetli (Görsel 25E), Saf PMMA (Görsel 23A) ve PMMA + otojen greft - BC (Görsel 25F) gruplarında ise zayıf olarak tespit edildi (**Tablo 7**).



Görsel 23: (A) görselinde zayıf VEGF ekspresyon seviyesi gösterilen Saf PMMA örneği ve (B) görselinde orta dereceli VEGF ekspresyon seviyesi gösterilen PMMA + Gentamisin grubu örneği. (A-B, VEGF X 20)



Görsel 24: (C) görselinde orta VEGF ekspresyon seviyesi gösterilen PMMA + Fusidi Asit örneği ve (D) görselinde yine orta dereceli VEGF ekspresyon seviyesi gösterilen PMMA + Teikoplanin grubu örneği. (A-B, VEGF X 20)



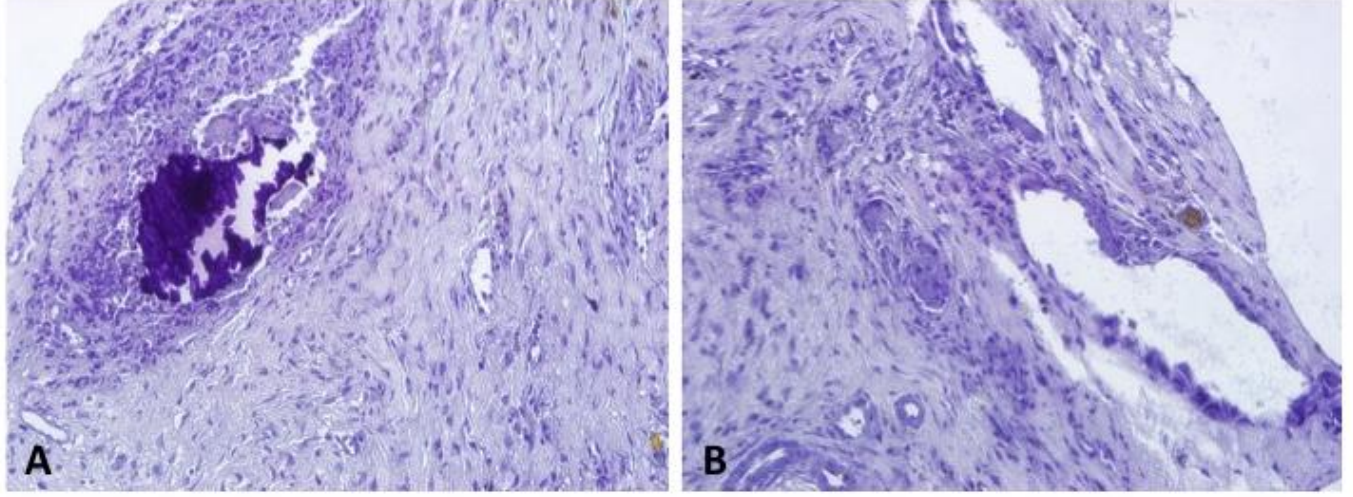
Görsel 25: (E) görselinde kuvvetli VEGF ekspresyon seviyesi gösterilen PMMA + Östrojen grubu örneği ve (F) görselinde zayıf dereceli VEGF ekspresyon seviyesi gösterilen PMMA + otojen greft (BC) grubu örneği. (A-B, VEGF X 20)

4.2.2 TGF-B EKSPRESYONU İLE DEĞERLENDİRME

TGF-b ekspresyonu değerlendirmesinde immuno reaktif skorlama (IRS) sistemi kullanıldı. Her alt gruptaki, her rat tek tek, tecrübeli bir histopatolog tarafından değerlendirildi ve aldığı puan bir tabloya kaydedilerek, her grubun ayrı ayrı da listelenmesi sağlandı (**Tablo 8**).

GRUPLAR	K	G	F	T	E	BC
1. RAT	1	2	3	2	3	0
2. RAT	1	2	2	2	4	2
3. RAT	1	2	4	2	3	1
4. RAT	0	3	3	2	4	1
5. RAT	1	2	2	1	3	0
6. RAT	1	2	2	2	3	2
7. RAT	0	2	1	1	3	2

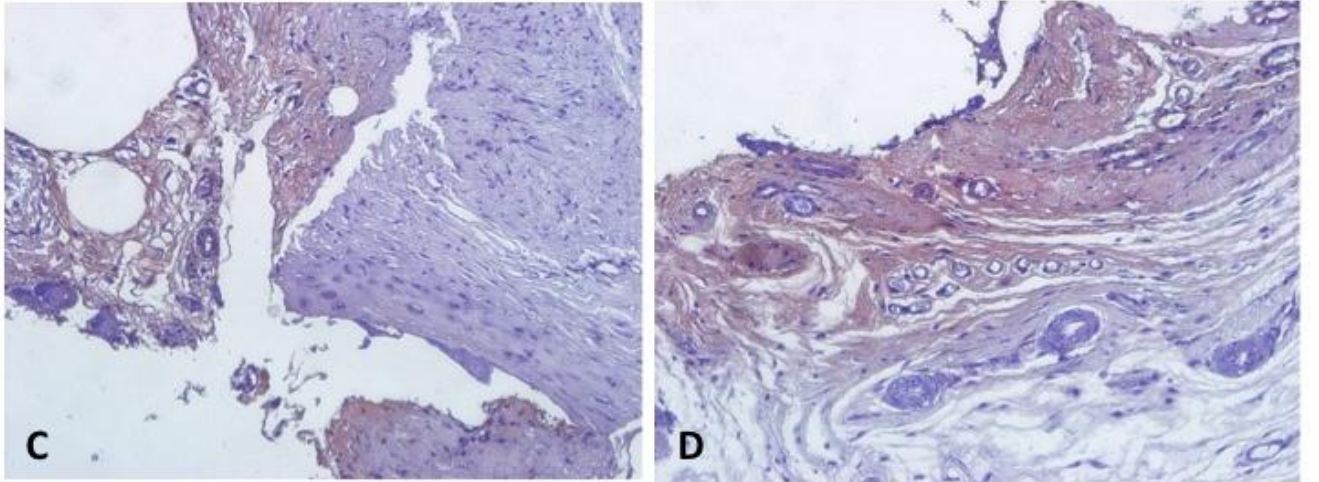
Tablo 8: Her gruptaki tüm ratların, TGF-b ekspresyonlarını gösteren tablo.



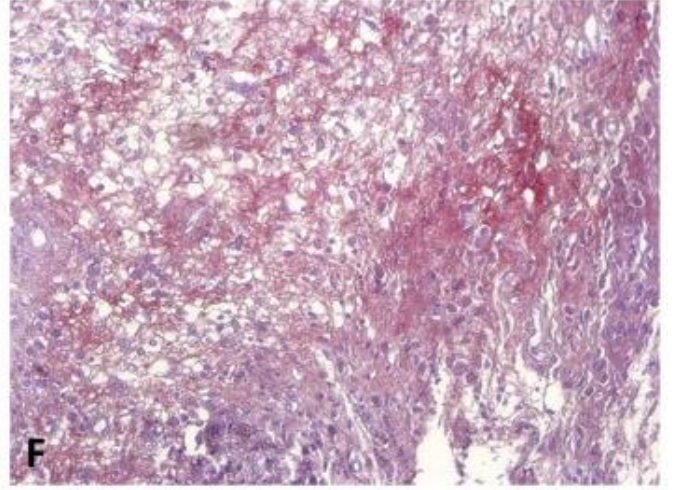
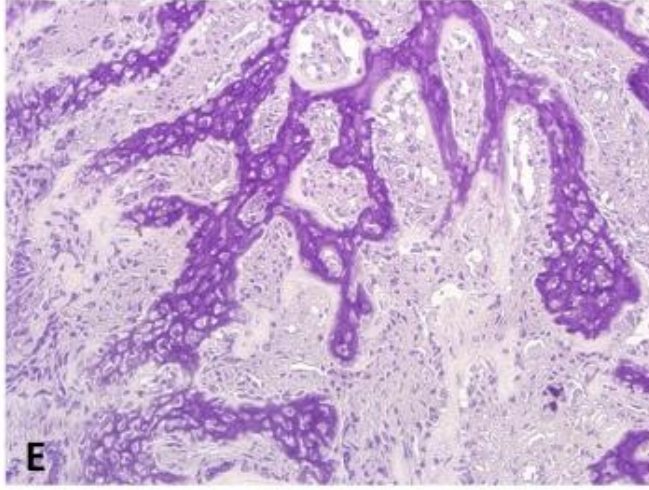
Görsel 26: Saf PMMA (A) içeren grupta; TGF-B ekspresyon seviyeleri. Her iki fotoğrafta da ekspresyon düzeylerinin oldukça düşük olduğu görülmektedir. (A-B, TGF-B X 20).

Yapılan değerlendirmede, östrojen grubunun TGF-b ve VEGF ekspresyonlarında ilk sıradaydı. TGF-b ekspresyonu değerlendirmesinde, östrojeni fusidik asit grubu izledi.

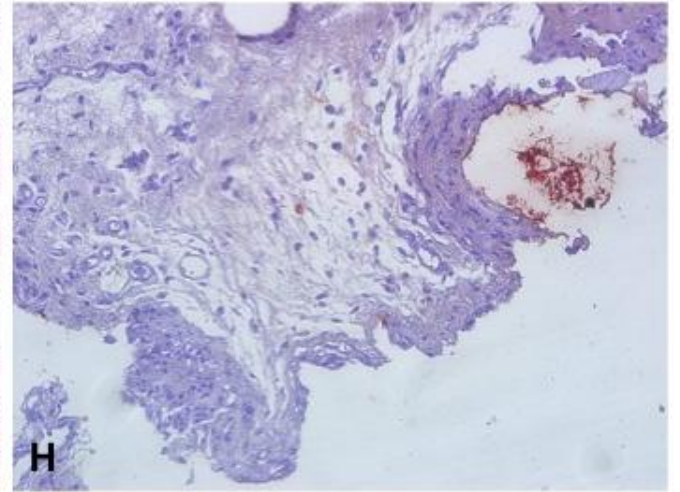
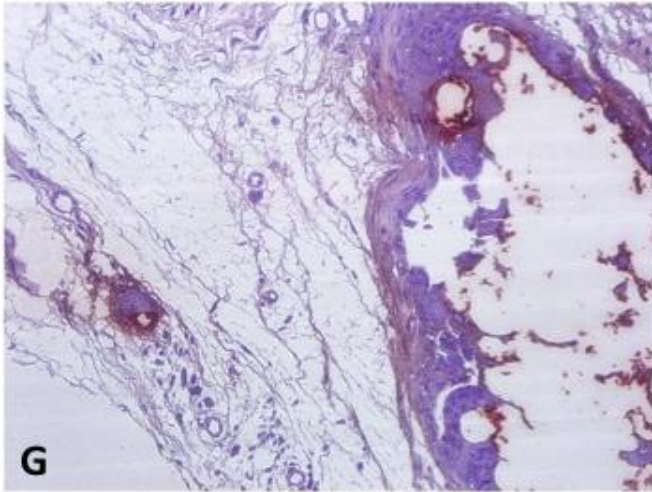
Tgf-b ekspresyonu ölçümlerinde, antibiyotik katkılı gruplar en yüksekten en düşüğe sırasıyla fusidik asit, gentamisin ve teikoplanindi. Östrojen grubunun tüm gruplar içinde ilk sırada olmasının yanında, antibiyotik katkılı grupların da otojen greftli ve saf çimentolu gruplardan daha ileri diferansiye durumdaydı.



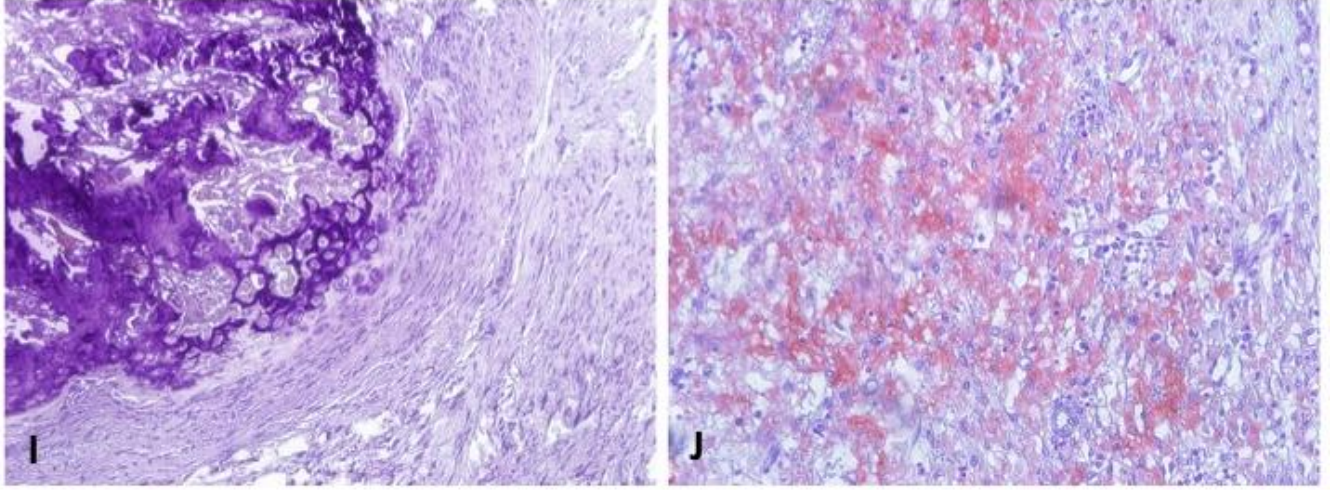
Görsel 27: PMMA+Gentamisin içeren grupta; TGF-B ekspresyon seviyeleri. Hiyalin kıkırdak bölgesinde zayıf (C), öncül hücrelerin bulunduğu alanlarda (D) ise orta şiddette ekspresyon varlığı dikkat çekicidir. (C-D, TGF-B X 20).



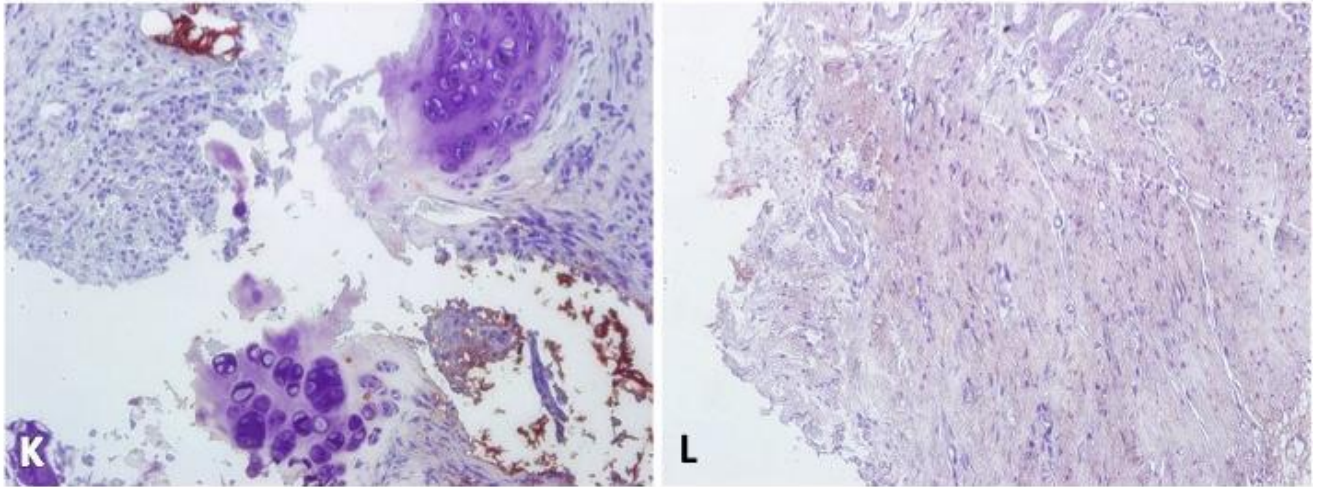
Görsel 28: PMMA+Fusidik asit içeren gruplarda; TGF-B ekspresyon seviyeleri. Öncül kemik sahaları içeren bölgelerde zayıf (E), öncül hücrelerin bulunduğu alanlarda (F) ise orta ve şiddetli seviyelerde ekspresyon varlığı belirgindir. (E-F, TGF-B X 20).



Görsel 29: PMMA+Teikoplanin içeren gruplarda; TGF-B ekspresyon seviyeleri. Hem öncül kemik sahalarının bulunduğu (G), hem de projenitör hücrelerden zengin sahalarda (H) ekspresyon şiddetinin oldukça zayıf oluşu görülüyor. (C-D, VEGF X 20).



Görsel 30: PMMA+Östrojen içeren gruplarda; TGF-B ekspresyon seviyeleri. Öncül kemik sahaları içeren bölgelerde zayıf (I), öncül hücrelerin bulunduğu alanlarda (J) ise orta ve şiddetli seviyelerde ekspresyon varlığı belirgindir. (I-J, TGF-B X 20).



Görsel 31: PMMA+Bone Chips içeren gruplarda; TGF-B ekspresyon seviyeleri. Hem öncül kıkırdak sahalarının bulunduğu (K), hem de projenitör hücrelerden zengin sahalarda (L) ekspresyon şiddetinin oldukça zayıf oluşuna dikkat ediniz. (K-L, VEGF X 20).

4.3 HISTOLOJİK VERİLERİN İSTATİSTİKSEL ÇÖZÜMLEMESİ

	Gruplar	SKOR	p
		(n) Ort.+SS Med. (Min.-Maks.)	
VEGF Ekspresyonu Skoru / İmmunoreaktif Skorlama	K	(n=7) 0,71±0,76 1- (0-2)	0,001
	G	(n=7) 2±0,58 2- (1-3)	
	F	(n=7) 1,71±0,76 2- (1-3)	
	T	(n=7) 2±0,58 2- (1-3)	
	E	(n=7) 3,14±0,69 3- (2-4)	
	BC	(n=7) 1±0,82 1- (0-2)	
	K	(n=7) 3,14±0,69 3- (2-4)	
	G	(n=7) 4,71±1,11 5- (3-6)	
Histopatolojik Skor	F	(n=7) 5,57±1,13 5- (4-7)	0,001
	T	(n=7) 5,57±1,27 6- (4-7)	
	E	(n=7) 6,86±1,57 7- (5-9)	
	BC	(n=7) 4,71±0,76 5- (4-6)	

Kruskall Wallis H testi

Gruplar	(n) Ort.+SS Med. (Min.-Maks.)	p
K	(n=7) 0,71±0,49 1- (0-1)	
G	(n=7) 2,14±0,38 2- (2-3)	
F	(n=7) 2,43±0,98 2- (1-4)	
TGF-B		p<0,001
T	(n=7) 1,71±0,49 2- (1-2)	
E	(n=7) 3,29±0,49 3- (3-4)	
BC	(n=7) 1,14±0,9 1- (0-2)	

Kruskall Wallis H testi

Tablo 9: Gruplara Göre Düzeylerin Karşılaştırılması

VEGF Skoru düzeyinde gruplara göre skor düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gösterdiği tespit edildi (p=0,001) (Tablo 9).

Histopatolojik Skor düzeyinde gruplara göre skor düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gösterdiği tespit edildi (p=0,001) (Tablo 9).

TGF-b düzeyinde gruplara göre skor düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gösterdiği tespit edildi (p<0,001).

Bu anlamlı farklılığın kaynağını tespit etmek amacıyla Bonferroni Dunn Çoklu karşılaştırma testi uygulandı. Uygulanan analiz sonucunda; (Tablo 10)

Vegf skoru düzeyinde, E grubunun medyan değerinin, K grubu (p=0,001) ve BC grubuna (p=0,002) göre daha yüksek düzeyde olduğu tespit edildi.

Histopatolojik skoru düzeyinde, K grubunun medyan değerinin, F grubu (p=0,023), T grubu (p=0,026) ve E grubuna (p=0,001) göre daha düşük düzeyde olduğu tespit edildi.

TGF-b düzeyinde, K grubunun medyan değerinin, F grubu ($p=0,025$), ve E grubu($p=0,026$) ve E grubuna($p=0,000$) göre daha düşük düzeyde olduğu tespit edildi.

TGF-b düzeyinde, E grubunun medyan değerinin, BC grubuna($p=0,002$) göre daha yüksek düzeyde olduğu tespit edildi.

		p
VEGF Skoru / IRS	K-E	0,001
	BC-E	0,002
Histopatolojik Skor	K-F	0,023
	K-T	0,026
	K-E	0,001
		p
TGF-b	K-F	0,025
	K-E	0,000
	BC-E	0,002

Tablo 10: İkili karşılaştırmalar

5. TARTIŞMA

Ortopedik cerrahide karşılaşılan en büyük problemlerden biri de büyük kemik defektlerinin rekonstrüksiyonudur. Cerrahi pratiğimizde kullanılmakta olan çözümlerin maliyet, uzun yatış süreleri, donör ve alıcı saha morbiditesi gibi sorunları mevcuttur.

Kemik defektlerinin rekonstrüksiyonunda kullanılabilecek seçeneklerin başında kemik greftleri gelmektedir. Konjenital, travmatik ve onkolojik rezeksiyonlar sonrasında oluşan defektlerin rekonstrüksiyonu amacıyla iliak krest, kalvariya ve kostal kemik greftleri alınabilmektedir (116).

Kemik defektlerinin geniş olduğu, radyoterapi görmüş olan alıcı yatağın uygun olmadığı travmatik, postonkolojik defektlerin rekonstrüksiyonunda serbest flep olarak vaskülarize kemik transferi tercih edilebilmektedir. Bu amaçla iliak kemik, fibula, radius, skapula en belli başlı kemik flebi seçenekleridir (117).

Masquelet, büyük defektlerdeki bu problem için yeni bir teknik tanımlamıştır(1, 2). *Giannoudis* ve arkadaşları, Masquelet tekniğini uyguladıkları çalışmalarında sonuçlarının son derece tatmin edici ve umut verici olduğunu bildirmişlerdir (65). Güncel literatürde kemik defekt rekonstrüksiyonu ile alakalı en büyük klinik serilerden birisi olan; *Azi* ve arkadaşları tarafından 2016 yılında yapılan çalışmada, indüklenen membran tekniği ile tedavi edilen 34 kritik segmental kemik defekti (ortalama 6.7 cm boyutunda) olan femur ve tibia vakalarının % 90' ının ortalama 8,5 ayda tam iyileşme gösterdiği bildirilmiştir. 2016 yılında *Mauffrey* ve arkadaşlarının yayınladıkları makalelerinde; Masquelet tekniğinin başarılı sonuçlar verdiğini bildirdiler (118).

Halen gelişmekte olan bir cerrahi uygulama olan Masquelet teknikte ilk ameliyatın en kritik aşaması, yabancı cisim reaksiyonu sonucu oluşan indüklenmiş membranın oluşumudur. Bizler gibi birçok araştırmacı, daha iyi bir İM oluşturmak ve bu membranın oluşum süresini kısaltmayı amaçlamaktadır. Bunun için sıklıkla uygulanan metot, deney hayvanlarında kullanılarak planlanan KBD modelleridir.

Birçok hayvan modeli non-union araştırmaları için kullanılmıştır. Ancak ratların özellikle travma araştırmalarında kullanımının artması, araştırmacıların ratlarla olan daha önceki çalışmalardan deneyimli olması ve son olarak ratlarda kırık oluşturma ve kaynamama modellerinin iyi tanımlanmış olması nedeniyle çalışmamızda rat kullanmaya karar verdik. *Harrison* ve arkadaşlarının ratlarla yaptıkları çalışmada, mid-diafizel femoral osteotomi

oluşturduktan sonra mini eksternal fiksator ile bir grupta 0,5 mm ve diğer grupta 3 mm gap kalacak şekilde femoral tespit yapılmıştır. Beş hafta sonra yapılan radyolojik değerlendirmede 0,5 mm gap bırakılan grupta kaynama görülürken, 3 mm gap bırakılan grupta non-union olduğu ifade edilmiştir (119). Yine *Poser ve arkadaşları*, ratlarda KBD standardizasyonu için tanımladıkları modelde, defekti 5 mm olarak planlamışlardır (120).

Biz rat femuruna uygun profilde ve boyutta plak vida seti ile önce plak vida ile köprüleme yapıp, ardından osteotomiyi gerçekleştirdik. Çıkardığımız segment, 6 delikli plağın orta 2 deliğinden önce oyulup sonra osteotomize edilmesiyle ortaya çıktığından yaklaşık 1 mm fark olabilmekle beraber, *Henrich ve arkadaşlarının* çalışmalarında da yaptıkları defekt uzunluğuyla aynı olarak ortalama 10mm uzunluğundaydı (4). Bu aynı zamanda KBD tanımında değindiğimiz üzere, ilgili kemik diyafiz çapının 2.0 ile 2.5 çarpılması şeklinde tanımlanan ölçüme uygun ve daha fazlaydı (10).

İki aşamalı bir teknik olan Masquelet tekniğinde, ikincil cerrahinin zamanlaması ile ilgili tartışmalar sürmektedir. *Henrich ve arkadaşları* çalışmalarında, neovasküler ve osteojenik aktivitenin 2 ile 4. haftalar arasında maksimum olduğunu ve 6. haftadan sonra azaldığını bildirdiler (4). Yine *Aho ve arkadaşları* da çalışmalarında İM aktivitesinin en yüksek olduğu tarih olan 4. Haftayı ikinci basamak cerrahinin yapılması gereken tarih olarak ifade ettiler (121). Biz de İM aktivitesinin maksimum olduğu 4. haftayı sakrifikasyon tarihi olarak belirledik.

İki aşamalı bir cerrahi olan bu tekniğin ilk aşamasında kullanılan kemik çimentonun içeriğini değiştirerek modifiye etmek mümkündür. Biz de oluşturduğumuz hayvan deneyi modelinde, bir yanda kontrol grubu olarak yalın çimentoyu bıraktık. Diğer yanda ise, kemik çimento içerisine eklediğimiz hormon ve otojen kortikal greft gibi endojen ayrıca gentamisin, teikoplanin ve fusidik asit gibi eksojen ajanlar kullanarak daha kaliteli bir membrana daha kısa sürede sahip olmayı denedik. 4. Haftada aldığımız örneklerin immunohistokimyasal ve histopatolojik değerlendirmeleri sonrasında, istatistiksel olarak anlamlılık çözümlmelerini yaparak, kantitatif ve objektif verilerle sonuçlarımızı görmeyi ve sunabilmeyi amaçladık.

Histomorfometrik ve histopatolojik analiz kemik hücreleri ve aktivitelerini in situ olarak değerlendirebilen tek yöntemdir. Bu yüzden histomorfometrik ve histopatolojik inceleme yöntemi kemik dokusunun değerlendirilmesinde altın standart olarak kabul edilmektedir(122). Kemik metabolizmasını değerlendirmede diğer hiçbir yöntem histomorfometrik ve histopatolojik inceleme yöntemi kadar etkili değildir(123).

Çalışmamızın verileri, *Huo ve arkadaşlarının* tanımladığı histopatolojik skora göre değerlendirilip, skorlandı (114). Histopatolojik olarak değerlendirdiğimizde, östrojen (E) grubunun en ileri diferansiyasyona sahip olduğu ve hemen neredeyse Kİ oluşum aşamasına geldiği görüldü. Bunu iyi derecede diferansiye olan fusidik asit (F) ve teikoplanin (T) grupları izledi. Ardından orta derecede diferansiyasyon gösteren otojen kortikal greft (BC) ve gentamisin (G) grupları geldi. Orijinal teknikte tanımlanan katkısız, yalın kemik çimentonun kullanıldığı (K) grup ise, tüm alt gruplar içerisinde son sırada yer aldı. Histopatolojik değerlendirmenin istatistiksel çözümlemesinde de K grubunun medyan değerinin, F grubu ($p=0,023$), T grubu ($p=0,026$) ve E grubuna ($p=0,001$) göre daha düşük düzeyde olduğu tespit edildi.

İmmunohistokimyasal değerlendirmeyi, VEGF ekspresyonuna bakarak yapılan skora ile değerlendirdik. Tüm deney gruplarına ait VEGF ekspresyon seviyeleri değerlendirildiğinde, gentamisin (G), fusidik asit (F) ve teikoplanin (T) gruplarında orta dereceli, östrojen (E) grubunda kuvvetli, yalın sementli kontrol grubu ve otojen diyafizer greftli BC gruplarında ise zayıf olarak tespit edildi. İmmunohistokimyasal değerlendirmenin istatistiksel çözümlemesinde E grubunun medyan değerinin, K grubu ($p=0,001$) ve BC grubuna ($p=0,002$) göre daha yüksek düzeyde olduğu tespit edildi.

Östrojenler, iskelet dahil olmak üzere vücuttaki çeşitli organ sistemlerinde güçlü etkilere sahiptir. Menopozdaki kadınlarda ve dişi kemirgenlerin ovariectomisinden sonra östrojen seviyelerinde düşüş, kemik kütlelerinin azalmasına neden olur ve östrojenle tedavi, hem insanlarda hem de deneysel çalışmalarda gösterildiği gibi bu kemik kaybını önler (124,125)

Bu nedenle, kadınlarda kemik sağlığına östrojenin önemi iyi bilinmektedir. Ek olarak, östrojenlerin erkek iskelet sağlığı için önemi gittikçe artmakta ve erkek kemiğinin gelişimi ve yetişkin erkek kemiğinin bakımı sırasındaki birçok olayın şimdi östrojenler tarafından düzenlendiği kabul edilmektedir (126). Yaşlı erkeklerde östrojen düzeylerinin kemik kitlesi ile ilişkili olduğu ve kırılma riskini öngördüğü gösterilmiştir (127,128) ve erkeklerin yaşa bağlı kemik kaybının temel olarak östrojen eksikliğinden kaynaklandığı ileri sürülmektedir (129).

Östrojenler, kadınlarda kemik kütlelerinin düzenlenmesi için çok önemlidir. Bununla birlikte, hem insanda hem de farede yapılan çeşitli çalışmalar, östradiolün (E2) erkeklerde

hem büyüyen hem de yetişkin iskeletin devamlılığı için de önemli olduğunu göstermektedir (126,130)

50 yaşından sonra osteoporotik kırıkların yaşam boyu riski erkeklerde % 20–25 oranında artabilir ve östrojen eksikliğinin erkeklerde yaşa bağlı kemik kaybına katkıda bulunabileceği ileri sürülmektedir (126,129).

Farman ve arkadaşları 2017 yılında yaptıkları hayvan modeli çalışmalarında, 5 aylık farelerin batınlarına, orşiektomi sonrasında osmotik östrojen (E2-estradiol) salınımı yapan minipompa implante ettiler. 3,5 hafta sonra çalışmayı sonlandırdıklarında yaptıkları radyolojik değerlendirmelerde, tibiada kortikal kalınlığında ve L5 vertebra toplam hacim başına trabeküler kemik hacminde önemli artış tespit ettiler. Yani bu çalışmaya göre, farelerde E2 tedavisinden sonra hem trabeküler hem de kortikal kemikler üzerinde belirgin anlamlı etkiler olmaktadır (131).

Östrojenin kemik üzerine etkileri uzun zamandır bilinmekte ve son dönem çalışmalar, sinyal iletim yollarına odaklanmaktadır. Bunun sebebi, östrojenin osteoprotektif özelliklerinden istifade edebilme isteğidir. Son yıllarda östrojenin, erkek osteoporozu üzerindeki etkileri de daha iyi anlaşıldıkça, östrojen sadece kadınlarla ilgili bir hormon gibi değerlendirilmemektedir. Bizim çalışmamızda da Farman ve arkadaşlarının çalışmasına benzer şekilde, östrojenin kemik üzerine ekstrasnükleer yollardan etki etmesi söz konusudur. Biz çalışmamızda, histopatolojik ve immunohistokimyasal açılardan bu etkiyi değerlendirdik ve umut vaadeen, güçlü sonuçlarla karşılaştık.

Yaptığımız literatür taramalarında, daha önce kemik çimentosuna **östrojen** eklenmesi ile herhangi bir çalışmaya rastlamadık. Çalışmamızın bu konuda bir ilk olması ve orjinal teknikte tarif edilen katkısız kemik çimentosuna karşı istatistiksl olarak anlamlı derecede daha iyi sonuçlar gözlememiz, oluşturulacak İM kalitesini artırma ve oluşma zamanını kısaltma isteğimize yanıt verecek türden bir gelişmedir.

Tekniğin orjinalinde, ikinci cerrahinin süresi için 6–10 haftalar arasının uygun olduğu ifade edilmiştir. Ancak unutulmamalıdır ki İM tekniği, enfeksiyon tamamen ortadan kaldırıldığında etkin bir yöntemdir (132). İM biyolojisinin daha iyi anlaşılmasıyla bu sürenin ortalama 4. haftaya kadar çekilebileceği birçok yayında gösterilmiştir (3,4,121). Hayvan deneyi modellerinde bu süre daha aşağılara çekilse dahi, bu konuda tek geçerli kural, enfeksiyonun eradike edilmesi ve yumuşak dokularda mükemmel iyileşmenin sağlanmasıdır.

Alain Masquelet'nin kemik çimento spacer'a antibiyotik eklemediğini ve bu uygulamayı bir subakut enfeksiyonu maskelemekten kaçınmak için önerdiğini; bunun yerine kanama odağına ulaşana dek (*paprika sign*) kaliteli ve geniş kemik debridmanı yapmanın önemi üzerinde durmaktadır (1,132)

Her ne kadar Masquelet, orijinal tekniğinde kemik çimentosunun kullanımını antibiyotiksiz olarak tarif etse ve önerse de, klinik pratikte ve birçok deneysel çalışmada antibiyotikli kemik çimentolar rutin kullanıma girmeye başlamıştır (132-134).

Henrich ve ark., Nau ve ark., yaptıkları hayvan modeli çalışmalarında, İM yapısı, yabancı cisim reaksiyonu, ikincil cerrahinin zamanlaması ve antibiyotik katkılı çimentoların oluşan membrana etkilerini araştırdılar (3,4). Bizi antibiyotik katkılı kemik çimentosu kullanımı konusunda en çok cesaretlendiren bulgularından biri şu şekildeydi: Orijinal teknikte tarif edildiği gibi yalın kemik çimentosu kullanılırsa, proliferatif aktivite 2 hafta sonra antibiyotik katkılı kemik çimento grubuna göre artar ancak 2 - 4 hafta arasında önemli ölçüde düşer. Buna karşın antibiyotikle zenginleştirilmiş çimentodaki 2 haftalık gruplarla karşılaştırıldığında proliferatif hücrelerin miktarı, 4 ile 6 hafta sonra da önemli ölçüde korunur (4).

Mauffrey ve arkadaşları ise 2016 yılında *Injury*' de yayınlanan yazısında, bize şu soruyu soruyor: **'Hangi dozajda hangi çimento ve hangi antibiyotikler ?'**

Kendi deneyimlerini ise şu şekilde aktarıyor: Özellikle geniş, segmental kemik defekti olan olgularda, normal viskoziteli kemik çimentosunu defekt büyüklüğüne göre 1 veya 2 torba kullanılmaktadır. Her bir çimento torbası için 3.6 gram tobramisin ve 3 g vankomisin eklenmesini ve fazladan bir monomer (sıvı) eklenmesini öneriyorlar. Bu ilave monomer eklenmezse, homojenize olmayan çimentonun el ile şekillendirilemediğini belirtmişlerdir (132-134).

Belirtmek gerekir ki biz de benzer gerekçeyle, hazır preperat kullandığımız gentamisin katkılı olan kemik çimento (*VERSABOND AB, Smith & Nephew*) dışında, yalın kemik çimentosu üzerine (*VERSABOND, Smith & Nephew*) eklediğimiz teikoplaninli ve fusidik asit katkılı çimentoyu hazırlarken rat başına 1-2cc monomer ekledik ve ifade edildiği gibi daha uygun akışkanlıkta ve mold edilebilmesi kolay bir spacer hazırlayabildik.

Ortopedik ve travma cerrahisinde ameliyat alanındaki lokal enfeksiyonları kontrol altına almak için genellikle kemik çimentoları antibiyotiklerle hazırlanır. Bu prosedür, antibiyotiklerin ilgili bölgede, oral veya intravenöz uygulamaya nazaran daha yüksek konsantrasyonlarda bulunmasını sağlar. Ayrıca *Nau ve arkadaşları*, membran özelliklerinin kullanılan antibiyotik ve çimento türüne bağlı olarak çok farklı olabileceğini bildirdiler (3).

Biz de, A. Masquelet' den farklı ve Mauffrey ve aşağıda örneklerini çoğaltacağımız birçok yazarın düşüncesine paralel olarak planladığımız modelde, kemik çimentoya eklediğimiz antibiyotikler ile tekniği uygulamaya geçirdik. Yaptığımız planda, klasik yöntemde spacer olarak kullanılan yalın kemik çimentosunu **kontrol** grubu olarak belirledik. Bunun yanında, artroplasti operasyonlarında rutin kullanıma uzunca bir süredir geçmiş olan, geniş antibakteriyel spektrumu ve termostabil özelliği nedeniyle dünya genelinde de tercih edilen **gentamisini** diğer bir grup olarak belirledik (141-143).

Gentamisin, geniş antibakteriyel spektrumu ve polimetilmetakrilat polimerizasyonu sırasında ulaşılan yüksek sıcaklıklarda sabit kalma kabiliyeti nedeniyle kemik çimentosunda en yaygın kullanılan antibiyotiktir. 1986 yılında enfekte olmuş 33 adet kalça proteziyle yatıkları bir çalışmada, *Weber ve Lautenbach*, preoperatif olarak izole edilen bakterilerin %29'unun gentamisine dirençli olduğunu belirtti (135). Ne yazık ki, gentamisin yüklü kemik çimentosu kullanılması sonrasından sonra direnç, ameliyat sonrası izole edilen bakterilerin% 41'ine yükselmiştir (136).

Çalışmamızın antibiyotik katkılı alt gruplarını planlarken, geniş etki spektrumuyla uzun süredir kullanılan gentamisine karşı artan direnç sorununa alternatif olarak görülebilecek fusidik asit ve teikoplanin gruplarını da değerlendirmek istedik.

Beeching ve arkadaşlarının yatığı in vitro çalışmanın sonuçlarında, gentamisin + fusidik asit kombinasyonunun, fusidik asit veya gentamisinin kemik çimento ile tek tek karıştırılarak yapılanlara göre çok daha kısa süre aktif olduğunu gösterdiler. Biz de bu düşünceden hareketle antibiyotikli çalışma gruplarımızı fusidik asit, gentamisin ve teikoplanin olarak ayrı ayrı kemik çimento ile karıştırıp karşılaştırmak istedik. (137).

Ayrıca fusidik asidin diğer antibiyotiklere eklenmesiyle yapılmış (137) çalışmalar veya osteomyelit modellerinde intramedüller çivi kaplaması veya antibiyotikli boncuk olarak denendiği çalışmaları mevcut olmakla beraber (136-138), İM etkilerini araştıran ve izole olarak kullanıldığı bir çalışma yoktu.

Bu düşünceden farklı şekilde *Neut ve arkadaşlarının* yaptıkları çalışmada, özellikle son dönemler artan dirençli suşlara ve biofilm tabakalarına karşı gentamisin yüklü kemik çimentosuna, Klindamisin veya Fusidik asit eklemenin, izole gentamisin ile karşılaştırıldığında daha etkili bir yöntem olduğu ortaya konmuştur (138).

Diğer bir antibiyotik alt grubumuz olan **fusidik asit**, 1960'lı yıllardan beri mevcut olan bir antibiyotiktir ve az sayıda çalışma, kemik enfeksiyonlarının tedavisi için fusidik asit kullanımını inceleyerek iyi etkinlik kanıtı vermiştir. Ayrıca, fusidik asit kemik çimentosunun hazırlanması sırasında oluşan yüksek sıcaklıklara maruz kaldığında sabit kalır. Bu sebeple

kemik çimentosuna eklenen fusidik asit özellikleri incelenmiştir (138). Beeching ve diğ. fusidik asidin, 7 haftaya kadar *Staphylococcus aureus*'un büyümesi üzerinde büyük inhibe edici etkileri olduğunu ve ilk haftada en büyük inhibitör etkisi olduğunu gösterdi (137).

2012 yılında Wang ve arkadaşları tarafından yayımlanan bu sistemik literatür taramasında, Asya'da fusidik aside (FA) direnç konusunda bir sürveyans verisi bulunmadığını ve 2000 yılından bu yana ortopedik enfeksiyonların tedavisi için FA kullanımına ilişkin hiçbir inceleme yapılmadığını belirtti. Fusidik asidin MRSA suçlarına karşı in vitro aktivitesi iyidir ve çoğu Asya ülkesinde düşük (<% 10) direnç oranları vardır. Asya'da FA, trimetoprim / sulfametoksazol ve klindamisin'den daha iyi oral anti-MRSA ajanı gibi görünmektedir. Kemik ve eklem enfeksiyonlarının tedavisi için 80'den fazla FA kullanımı vakası 2000'den beri bildirilmiştir ve rekürrens veya başarısızlık oranı <% 10'dur. Kuzey Amerika ve Avrupa'da fusidik asit direnci, *S. aureus*'taki direnç prevalansı 1990'lardan bu yana düşük düzeydedir. Ancak son zamanlarda topikal FA'ye maruz kalmanın, FA-dirençli *S. aureus*'un varlığı ile korele olduğuna dair bir endişe de vardır (139).

Fusidik asit ile ilgili az sayıdaki in vitro çalışmalar, plaster of Paris (POP) boncuklarının kullanımına ilişkin iki adet bildiriye. *Mousset ve arkadaşları*, 11 farklı antibiyotiği 37 ° C'de depoladıktan sonra antibakteriyel etkinliği test ettiler. Toplam FA'nin % 65'i 2. haftada ve % 60'ı 3. haftada halen tespit edildi (140).

Mackey ve arkadaşları ise fusidik asidin 50. günde dahi uygun doz seviyelerinde yavaşça salındığını gösterdiler. Ayrıca çalıştıkları diğer antibiyotikler olan linkomisin, gentamisin ve sefazolinin sıvada daha yüksek konsantrasyonlarda bulunmalarına rağmen, hepsinin fusidik asitten daha kısa sürelerde ve daha düşük miktarlarda salındıklarını bildirdiler (141).

Varlet ve arkadaşları, tavşan ile yaptıkları deneylerinde POP boncuklardaki fusidik asit ve gentamisinin osteogenez üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığı gösterdiler (142).

Chang ve arkadaşları, teikoplanin, vankomisin ve daptomisin katkılı kemik çimentoların farklı dozlardaki etkilerini; MSSA, MRSA ve VISA (vancomisin aracılı *Staf. Aureus*) bakterileri karşısında in vitro ortamda karşılaştırdılar. Vardıkları sonuç, teicoplanin yüklü çimento, in vitro tahlilde daptomisin veya vankomisin ile yüklü çimentolarla karşılaştırıldığında, MSSA, MRSA ve VISA suşlarına karşı eşit veya daha iyi antibakteriyel aktivite sağlamıştır. Ayrıca **teikoplanin**, *S. aureus* enfeksiyonunun antibiyotik yüklü kemik çimentoları ile tedavisi için daptomisin veya vankomisin ile karşılaştırıldığında daha iyi bir seçim olduğunu bildirdiler (143).

Biz de bu sebeple, klinik pratikte çokça tercih edilen bu antibiyotiklerden hem kemik ve eklem enfeksiyonlarında sıkça kullandığımız ve termostabil yapısı bilinen teikoplanin ile bir alt grup oluşturduk. Hem izoleolarak etkinliğini görmek istedik, hem de yalın kemik çimentosu grubuyla ayrıca da gentamisin ve fusidik asit grupları ile karşılaştırma yapmayı planladık. Histopatolojik değerlendirme sonuçlarına göre, yalın kemik çimento kullandığımız K grubu, fusidik asit ve teikoplanin gruplarımıza göre istatistiksel olarak anlamlı derecede güçsüz çıktı. Ayrıca immunohistokimyasal değerlendirmede, antibiyotik katkılı F, T ve G grupları istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, daha ileri derecede diferansiye çıktılar.

Zhiju ve arkadaşları 2018 yılında klinik sonuçlarını yayınladıkları çalışmalarında, 40 g kemik çimentoya 1g vankomisin ekleyerek kemik spacer'larını hazırladıklarını belirttiler. Bu yaklaşımın, travmatik tibia osteomyelit vakalarında etkili bir şekilde iyileşme süresini kısaltabileceğini; kısalan tedavi sürelerinin, diz ve ayak bileği eklem fonksiyonlarını iyileştirebileceği ve yara bölgesi enfeksiyonunu ortadan kaldıracabileceğini savundular. Bu nedenle, kapsamlı klinik uygulama için umut verici bir potansiyele sahiptir (144).

Giannoudis ve arkadaşları da 2016 yılında kendi sonuçlarını ve protokolünü yayınlarken, rutin olarak 40g kemik çimento içerisine 2 g vankomisin eklediğini ifade etti. Bunun yanında yalnızca, re-enfeksiyon vakalarında bunu yapmadığını belirtti. Ayrıca yine Giannoudis ve arkadaşlarının da ifade ettiği gibi İM tekniği artık enfekte kaynamama olgularında da iyi bir alternatif olarak görülmektedir (145).

Azi ve arkadaşları da, post travmatik kemik defektlerinin tedavisinde İM tekniğini kullanırken, 40 g kemik çimento içerisine 3 g gentamisin ve 4 g da vankomisin ekliyorlar (146).

Görüldüğü üzere, çok farklı yazarlar tarafından yayınlanmış yazılarda, kemik çimento içerisine antibiyotik ekleyerek kullanma eğilimi olduğu ortadadır. Bununla beraber Mauffrey' in de sorduğu gibi hangi antibiyotiğin, hangi dozda ve hangi kemik çimentosuyla kullanılması gerektiğine dair bir konsensus bulunmamaktadır.

Otojen greft (BC) grubu, histopatolojik açıdan orta düzeyde çıkmasına ve hisptopatolojik skorlamada, VEGF ve TGF-b eksrpresyon seviyelerinde yalın çimento grubundan daha güçlü ölçülmesine karşın, bunlar istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ayrıca tüm ölçümlerde K grubundan daha güçlü çıkmasına karşın, diğer tüm grupların gerisindeydi.

Bunun olası sebepleri arasında, alınan greftin defekt bölgesinden temin edilen diyafizer kortikal greft olması, küçültülüp kemik çimentoya eklendiğinde iç kısımlarda kalarak yeterli salınımı yapamaması ve özellikle katılaşma esnasında yüksek sıcaklıklara çıkan çimentonun yaydığı enerjiden dolayı termal hasara uğramış olma olasılığı sayılabilir.

Çalışmamız, bu güncellenen konseptlere uygun şekilde, kemik çimento içerisine antibiyotik eklenebileceğini bildirmenin yanında teikoplanin, fusidik asit ve gentamisin uygun dozlarda eklenmesinin İM membran kalitesini bozmadan, oluşma süresini kısaltabileceğini, ayrıca lokal enfeksiyon, erken mobilizasyon sayesinde eklem hareket açıklığının artması ve yara yeri sorunlarının azalması gibi bazı faydaları bulunabileceğini de ifade etmek isteriz. Özellikle bizden önce izole olark İM çalışmalarında denenmemiş olan fusidik asit, henüz cerrahi pratiğe sınırlı şekilde girmiş olup, MRSA suşları ve biyofilmler ile mücadele konusunda umut vadeden bir ajan olarak değerlendirilebilir.

Ayrıca bizden önce hiçbir çalışmada denenmemiş olan ve daha önceki paragraflarda detaylıca anlatıldığı üzere östrojenin, kemik sement içerisine eklenerek, lokal yüksek dozlarının operasyon sahasında bulunması sonucunda daha kısa sürede yüksek diferansiyasyon gösterdiği tespit edilmiş olup, kısa sürede yüksek kalitede İM oluşturabileceğine dair güçlü kanıtlar sunulmaktadır. Hem histopatolojik hem de immunohistokimyasal ölçüm ve skorlamaların istatistiksel değerlendirmesinde istatistiksel olarak anlamlı derecede güçlü çıkmıştır.

Çalışmamızın sınırlayıcıları ve eksik yönlerini ele alacak olursak,

- İM değerlendirmesi temel hedefimiz olduğundan sakrifikasyon tarihini 4. Hafta olarak belirlemiştik. Bu sebeple radyolojik açıdan anlamlı olabilecek bir sonuç alamadık.
- Maddi sebeplerden dolayı, daha fazla sayıda ve daha spesifik immunohistokimyasal kitler temin edemedik.
- Etik gerekçelerle grup ve hayvan sayısını en aza indirmek amacıyla, antibiyotiklerin farklı doz ve kombinasyonlarını değerlendiremedik.
- Çalışmamızda spacer olarak sadece PMMA ile çalıştık. Literatürde farklı spacer arayışları varken, ilerleyen çalışmalarımızda bunları değerlendirmeyi düşünebiliriz.

6. SONUÇLAR

Halen gelişmekte olan bir cerrahi uygulama olan Masquelet tekniğinin en kritik aşaması, yabancı cisim reaksiyonu sonucu oluşan indüklenmiş membranın oluşumudur. Bizler gibi birçok araştırmacı, daha iyi bir İM oluşturmak ve bu membranın oluşum süresini kısaltmayı amaçlamaktadır.

İki aşamalı bir cerrahi olan bu tekniğin ilk aşamasında kullanılan kemik çimentonun içeriğini değiştirerek modifiye etmek mümkündür. Biz de oluşturduğumuz hayvan deneyi modelinde, bir yanda kontrol grubu olarak yalın çimentoyu bıraktık. Diğer yanda ise, kemik çimento içerisine eklediğimiz hormon ve otojen kortikal greft gibi endojen ayrıca gentamisin, teikoplanin ve fusidik asit gibi eksojen ajanlar kullanarak daha kaliteli bir membrana daha kısa sürede sahip olmayı denedik. 4. Haftada aldığımız örneklerin immunohistokimyasal ve histopatolojik değerlendirmeleri sonrasında, istatistiksel olarak anlamlılık çözümleri yapıldı.

Histopatolojik olarak değerlendirdiğimizde, östrojen (E) grubunun en ileri diferansiyasyona sahip olduğu ve hemen neredeyse Kİ oluşum aşamasına geldiği görüldü. Bunu iyi derecede diferansiye olan fusidik asit (F) ve teikoplanin (T) grupları izledi. Ardından orta derecede diferansiyasyon gösteren otojen kortikal greft (BC) ve gentamisin (G) grupları geldi. Orijinal teknikte tanımlanan katkısız, yalın kemik çimentonun kullanıldığı (K) grup ise, tüm alt gruplar içerisinde son sırada yer aldı. Histopatolojik değerlendirmenin istatistiksel çözümlemesinde de K grubunun medyan değerinin, F grubu ($p=0,023$), T grubu ($p=0,026$) ve E grubuna ($p=0,001$) göre daha düşük düzeyde olduğu tespit edildi.

İmmunohistokimyasal değerlendirmeyi, TGF-b ve VEGF ekspresyonuna bakarak yapılan skorumla ile değerlendirdik. Tüm deney gruplarına ait VEGF ekspresyon seviyeleri değerlendirildiğinde, gentamisin (G), fusidik asit (F) ve teikoplanin (T) gruplarında orta dereceli, östrojen (E) grubunda kuvvetli, yalın sementli Kontrol grubu ve otojen diyafizer greftli BC gruplarında ise zayıf olarak tespit edildi. İmmunohistokimyasal değerlendirmenin istatistiksel çözümlemesinde E grubunun medyan değerinin, K grubu ($p=0,001$) ve BC grubuna ($p=0,002$) göre daha yüksek düzeyde olduğu tespit edildi. Ayrıca, TGF-b düzeyinde gruplara göre skor düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gösterdiği tespit edildi. TGF-b ekspresyon seviyelerine göre östrojen grubu en güçlü ve fusidik asit grubu ise ikinci sırada güçlü olarak tespit edildi. E grubunun hem K hem de BC grubuna göre ve F grubunun ise K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede üstün olduğu ortaya kondu.

7. KAYNAK LİSTESİ

1. Masquelet, A. Et al. Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft. In Annales de chirurgie plastique et esthetique. 2000.
2. Pelissier, P, et al., Behaviour of cancellous bone graft placed in induced membranes. British journal of plastic surgery, 2002. 55(7): p. 596-598.
3. Nau, C, et al. , Alteration of Masquelet's induced membrane characteristics by different kinds of antibiotic enriched bone cement in a critical size defect model in the rat's femur,*Injury*-2015
4. Heinrich, D, et al., Establishment and characterization of the Masquelet induced membrane technique in a rat femur critical-sized defect model. Journal of Tissue engineering and regenerative medicine, 2013.
5. Einhorn, T.A., *The cell and molecular biology of fracture healing*. Clinical Orthopaedics and Related researchr, 1998. 355: p. S7-S21.
6. Phillips AM. Overview of the fracture healing cascade, Int J Care Injured 2005;36:5-7
7. Einhorn TA, Hirschman A, Kaplan C, Nashed R, Devlin VJ, Warman J. Neutral protein-degrading enzymes in experimental fracture callus: a preliminary report. J Orthop Res 1989; 7:792-805.
8. Nauth A, mckee MD, Einhorn TA, et al. Managing bone defects. J Orthop Trauma. 2011;25:462–466
9. Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size! Emil H. Schemitsch, MD, FRCS
10. Gugala Z, Lindsey RW, Gogolewski S: New approaches in the treatment of critical-size segmental defects in long bones. Macromolecular Symposia 2007, 253:147–161.
11. Maksillofasiyal Cerrahide Kritik Boyut Defekti Kavramı The Concept of Critical Size Defect in Maxillofacial Surgery Süleyman BOZKAYA
12. Haverstock, B.D. and V.J. Mandracchia, Cigarette smoking and bone healing: implications in foot and ankle surgery. The journal of foot and ankle surgery, 1998. 37(1): p.69-74.
13. Browner, B.D., Skeletal trauma: basic science, management, and reconstruction. Vol.1. 2009: Elsevier Health Sciences.
14. Mandt, P.R. and D.H. Gershuni, Treatment of nonunion of fractures in the epiphyseal-metaphyseal region of long bones. Journal of orthopaedic trauma,198.1(2):p.141-151.
15. Praemer, A., et al., Musculoskeletal conditions in the United States. 1992.

16. Chapman, M.W., R.M. Szabo, and R.A. Marder, *Chapman's orthopaedic surgery*. Vol.10. 2001: Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia.
17. Marsh, D., Concepts of fracture union, delayed union, and nonunion. *Clinical orthopaedics and related research*, 1998. **355**: p. S22-S30.
18. Frolke, J.P.M. and P. Patka, definition and classification of fracture non-unions. *Injury*, 2007. **38**: p. S19-S22.
19. Guarniero, R., et al., Study of fracture healing in protein malnutrition. *Revista paulista de medicina*, 1992. **110**(2): p. 63-68.
20. Kyro, A., et al. Are smokers a risk group for delayed healing of tibial shaft fractures in *Annales chirurgiae et gynaecologiae*. 1993.
21. Schmitz, M.A., et al., *Effect of smoking on tibial shaft fracture healing*. *Clinical orthopaedics and related research*, 1999(365): p. 184-200.
22. Beam, H.A., J.R. Parsons, and S.S. Lin, The effects of blood glucose control upon fracture healing in the BB Wistar rat with diabetes mellitus. *Journal of Orthopaedic Research*, 2002. **20**(6): p. 1210-1216.
23. Ziroglu N., Huri G., Femur şaft kaynamama, *TOTBİD Dergisi* 2017; 16:568–572
24. Friedenber, Z. And C.T. Brighton, *Bioelectric potentials in bone*. *J Bone Joint Surg Am*, 1966. **48**(5): p. 915-923.
25. Scott, G. And J. King, A prospective, double-blind trial of electrical capacitive coupling in the treatment of non-union of long bones. *J Bone Joint Surg Am*, 1994. **76**(6): p. 820-826.
26. Kristiansen, T.K., et al., Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound. A multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Bone Joint Surg Am*, 1997. **79**(7): p. 961-73.
27. Heckman, J.D., et al., acceleration of tibial fracture-healing by non-invasive, lowintensity pulsed ultrasound. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 1994. **76**(1): p. 26-34.
28. Mayo, K. And S. Benirschke, Treatment of tibial malunions and nonunions with reamed intramedullary nails. *The Orthopedic clinics of North America*, 1990. **21**(4): p. 715-724.
29. Ohtsuka, H., et al., Use of antibiotic-impregnated bone cement nail to treat septic nonunion after open tibial fracture. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 2002. **52**(2): p. 364-366.

30. Qiang, Z. And L. Hang, Use of antibiotic cement rod to treat intramedullary infection after nailing: preliminary study in 19 patients. Archives of orthopaedic and trauma surgery, 2007. **127**(10): p. 945-951.
31. Bellabarba, C., W.M. Ricci, and B.R. Bolhofner, Results of indirect reduction and plating of femoral shaft nonunions after intramedullary nailing. Journal of orthopaedic trauma, 2001. **15**(4): p. 254-263.
32. Hierholzer, C., et al., Plate fixation of ununited humeral shaft fractures: effect of type of bone graft on healing. JBJS, 2006. **88**(7): p. 1442-1447.
33. Richmond, J., et al., Nonunions of the distal tibia treated by reamed intramedullary nailing. Journal of orthopaedic trauma, 2004. **18**(9): p. 603-610.
34. Wu, C.-C., Retrograde dynamic locked nailing for femoral supracondylar nonunions after plating. Journal of Trauma and Acute Care Surgery, 2009. **66**(1): p. 195-199.
35. Wu, C.-C., Exchange nailing for aseptic nonunion of femoral shaft: a retrospective cohort study for effect of reaming size. Journal of Trauma and Acute Care Surgery, 2007. **63**(4): p. 859-865.
36. Grundnes, O., S.E. Utvag, and O. Reikeras, restoration of bone flow following fracture and reaming in rat femora. Acta Orthopaedica Scandinavica, 1994. **65**(2): p. 185-190.
37. Whittle, A.P., W. Wester, and T.A. Russell, *Fatigue failure in small diameter ,bial nails*. Clinical orthopaedics and related research, 1995(315): p. 119-128.
38. Frolke, J.P.M., et al., Viable osteoblastic potential of cortical reamings from intramedullary nailing. Journal of orthopaedic research, 2004. **22**(6): p. 1271-1275.
39. Wenisch, S., et al., Human reaming debris: a source of multipotent stem cells. Bone, 2005. **36**(1): p. 74-83.
40. Pihlajamaki, H.K., S.T. Salminen, and O.M. Bostman, The treatment of nonunions following intramedullary nailing of femoral shaft fractures. Journal of orthopaedic trauma, 2002. **16**(6): p. 394-402.
41. Oh, J.K., et al., Treatment of femoral and tibial diaphyseal nonunions using reamed intramedullary nailing without bone graft. Injury, 2008. **39**(8): p. 952-959.
42. Weresh, M.J., et al., Failure of exchange reamed intramedullary nails for ununited femoral shaft fractures. Journal of orthopaedic trauma, 2000. **14**(5): p. 335-338.
43. Brinker, M.R. and D.P. O'Connor, *Exchange nailing of ununited fractures*. The Journal of Bone & Joint Surgery, 2007. **89**(1): p. 177-188.

44. Templeman, D., et al., Exchange reamed intramedullary nailing for delayed union and nonunion of the tibia. *Clinical orthopaedics and related research*, 1995(315): p. 169-175.
45. Schwartzman, V., S.H. Choi, and R. Schwartzman, Tibial nonunions. Treatment tactics with the Ilizarov method. *The Orthopedic clinics of North America*, 1990. **21**(4): p. 639-653.
46. Madanagopal, S.G., D. Seligson, and C.S. Roberts, The antibiotic cement nail for infection after tibial nailing. *Orthopedics*, 2004. **27**(7): p. 709-712.
47. Cole, J., *The vascular response of bone to internal fixation*. The science and practice of intramedullary nailing, 2nd edn. Williams and Wilkins, 1996: p. 43-69.
48. Papakostidis, C., et al., Femoral-shaft fractures and nonunions treated with intramedullary nails: the role of dynamisation. *Injury*, 2011. **42**(11): p. 1353-1361.
49. Wu, C. And C.-H. Shih, Effect of dynamization of a static interlocking nail on fracture healing. *Canadian journal of surgery. Journal canadien de chirurgie*, 1993. **36**(4): p. 302-306.
50. Cattaneo, R., M. Catagni, and E.E. Johnson, The treatment of infected nonunions and segmental defects of the tibia by the methods of Ilizarov. *Clinical orthopaedics and related research*, 1992(280): p. 143-152.
51. Başbozkurt, M., B. Demiralp, and V. Kırdemir, *Psodoartrozların ilizarov Yontemi ile Tedavisi*. 2004.
52. Atkins, R.M., Principles of management of septic non-union of fracture. *Injury*, 2007. **38**: p. S23-S32.
53. Catagni, M.A., et al., distraction osteogenesis in the treatment of stiff hypertrophic nonunions using the Ilizarov apparatus. *Clinical orthopaedics and related research*, 1994. **301**: p. 159-163.
54. Kabata, T., et al., reconstruction with distraction osteogenesis for juxta-articular nonunions with bone loss. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 2005. **58**(6): p. 1213-1222.
55. Kocaoglu, M., et al., Management of stiff hypertrophic nonunions by distraction osteogenesis: a report of 16 cases. *Journal of orthopaedic trauma*, 2003. **17**(8): p. 543-548.
56. Cierny 3rd, G. And K.E. Zorn, Segmental tibial defects. Comparing conventional and Ilizarov methodologies. *Clinical orthopaedics and related research*, 1994(301):p. 118-123.

57. Marsh, D., et al., The Ilizarov method in nonunion, malunion and infection of fractures. *J Bone Joint Surg Br*, 1997. **79**(2): p. 273-279.
58. Ilizarov, G.A., Clinical application of the tension-stress effect for limb lengthening. *Clinical orthopaedics and related research*, 1990(250): p. 8-26.
59. Chapman, M.W. and C.G. Finkemeier, Treatment of supracondylar nonunions of the femur with plate fixation and bone graft. *JBJS*, 1999. **81**(9): p. 1217-28.
60. Ikeda, K. et al., Long-term follow-up of vascularized bone grafts for the reconstruction of tibial nonunion: evaluation with computed tomographic scanning. *The Journal of trauma*, 1992. **32**(6): p. 693-697.
61. Banic, A. and R. Hertel, Double vascularized fibulas for reconstruction of large Tibial defects. *Journal of reconstructive microsurgery*, 1993. **9**(06): p. 421-428.
62. Han, C.-S., M. Wood, and A.T. Bishop, *Vascularized bone transfer*. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 1992. **74**(10): p. 1441-1449.
63. Bielecki, T., T. Gazdzik, and T. Szczepanski, Benefit of percutaneous injection of autologous platelet-leukocyte-rich gel in patients with delayed union and nonunion. *European Surgical Research*, 2008. **40**(3): p. 289-296.
64. Mariconda, M., et al., Platelet gel supplementation in long bone nonunions treated by external fixation. *Journal of orthopaedic trauma*, 2008. **22**(5): p. 342-345.
65. Giannoudis, P.V., et al., The synergistic effect of autograft and BMP-7 in the treatment of atrophic nonunions. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2009. **467**(12): p. 3239
66. Beresford, J.N., *Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow*. *Clinical orthopaedics and related research*, 1989(240): p. 270-280.
67. Sen, M. and T. Miclau, Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions? *Injury*, 2007. **38**(1): p. S75-S80.
68. Ueng, S.W., et al., Bone healing of Tibial lengthening is delayed by cigarette smoking: study of bone mineral density and torsional strength on rabbits. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 1999. **46**(1): p. 110-115.
69. Weiland, A.J., T.W. Phillips, and M.A. Randolph, Bone grafts: a radiologic, histologic, and biomechanical model comparing autografts, allografts, and free vascularized bone grafts. *Plastic and reconstructive surgery*, 1984. **74**(3): p. 368-379.
70. Hertel, R., et al., 10. Cancellous bone graft for skeletal reconstruction Muscular versus periosteal bed, Preliminary report. *Injury*, 1994. **25**: p. SA59-SA70.

71. Klaue, K., U. Knothe, and A. Masquelet, Effet biologique des membranes a corps etranger induites in situ sur la consolidation des greffes d'os spongieux. Rev Chir Orthop Suppl, 1995. **70**: p. 109-110.
72. Masquelet, A., et al. Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft. in Annales de chirurgie plastique et esthetique. 2000.
73. Masquelet, A.C. and T. Begue, The concept of induced membrane for reconstruction of long bone defects. Orthopedic Clinics, 2010. **41**(1): p. 27-37.
74. Klaue, K., et al., Biological implementation of "in situ" induced autologous foreign body membranes in consolidation of massive cancellous bone grafts. J Bone Joint Surg Br, 1993. **79**: p. 236.
75. Anderson, J.M., A. Rodriguez, and D.T. Chang. *Foreign body reac,on to biomaterials.in Seminars in immunology*. 2008. Elsevier.
76. Patel, J., et al., Foreign body-induced granulation tissue is a source of adult stem cells. Translational Research, 2010. **155**(4): p. 191-199
77. Viateau, V., et al., InductiIon of a barrier membrane to facilitate reconstruction of massive segmental diaphyseal bone defects: an ovine model. Veterinary Surgery, 2006. **35**(5): p. 445-452.
78. Azap, A, et al., Fusidik asidin Staphylococcus aureus suşlarına karşı in-vitro etkinliği. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 2005; 58:39-41.
79. Mariane Machado Curbete & Hérída Regina Nunes Salgado (2015): A critical review of the properties of fusidic acid and the analytical methods for its determination, Critical Reviews in Analytical Chemistry, DOI: 10.1080/10408347.2015.1084225
80. Brumfitt W, Hamilton Miller J. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. N Engl J Med 1989;320:1188-1196.
81. Markowitz N, Quinn EL, Saravolatz LD. Trimethoprim-sulfamethoxazole compared with vancomycin for the treatment of Staphylococcus aureus infection. Ann Intern Med 1992;117:390-398.
82. Collignon P, Turnidge J. Fusidic acid in vitro activity. Int J Antimicrob Agents 1999;12:45-68.
83. Mandell LA. Fusidic Acid. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed. Philadelphia: Churchill-Livingstone, 2000;306-307.
84. Verbist L. The antimicrobial activitiy of fusidic acid. Journal of Antimicrob Chemother 1990;25:Suppl. B:1-5.

85. Toma E, Barriault D. Antimicrobial activity of fusidic acid and disk diffusion criteria for Gram-positive cocci. *J Clin Microbiol* 1995;33:1712-1715.
86. Çokça F. Aminoglikozidlerin farmakolojisi ve klinik farmakolojisi. Tulunay FC, Ergün H (eds.). *Antibiyotiklerin Klinik Farmakolojisi'nde*, İstanbul: Klinik Farmakoloji Derneği Yayını, 2000; 37-45.
87. Gilbert DN. Aminoglycosides. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R(eds.). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5th edition, Philadelphia, Churchill Livingstone, 2000; 307-36.
88. Reese RE, Betts RF, Gumustop B. *Handbook of Antibiotics*. 3th edition, Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2000.
89. Tabak F. Aminoglikozidler. Yücel A, Tabak F, Öztürk R, Mert A (eds). *Günümüzde Antimikrobik Tedavi.*, İstanbul: İstanbul Bulaşıcı Hastalıklarla Savaş Derneği Yayın no: 12. 1998; 58-64.
90. Coronelli C, Gallo GG, Cavalleri B. Teicoplanin: chemical, physico-chemical and biological aspects, *fi Farmaco*, 42(10), 767-785, 1987.
91. Samina S, Gastaldo L, Corti A. Teicoplanin, a new antibiotic from actinoplanes teichomyceticus nov. sp., *Antimicrob.Agents Chemother.*, 26 (6), 917-923, 1984.
92. Arriaga P, Laynez), Menendez M, Canada), and Garcia- Blanco F. Thermodynamic analysis of the interaction of the antibiotic teicoplanin and is aglycone with cell-wall peptides, *Biochem. f.*, 265, 69-77, 1990.
93. Yenice İ., Çalış S, *Biyoyararlarum Dosyası : Teikoplanin*, FABADJ. Pharın. Sci., 26. 143-155, 2001
94. Greenwood D. Microbiological properties of teicoplanin, *J Antimic. Chem.*, 21, Suppl. A, 1-13, 1988.
95. W.F., G., *Review of Medical Physiology*. 21 ed2003: McGraw-HillProfessional.
96. D.K., G., *Hormones of the gonads*, in *Harper's Biochemistry*, M.R.G.D.K.M.P.R. V.W., Editor 2000, McGraw-Hill: USA. p. 594-609.
97. Guyton, A.C., *Guyton & Hall Textbook Of Medical Physiology*. 11 Ed2005: Saunders/Elsevier.
98. Gennari, L., Ve Ark., Estrogen Receptor Gene Polymorphisms And The Genetics Of Osteoporosis: A Huge Review. *Am J Epidemiol*, 2005. **161**(4): P. 307-20.
99. Walter, P., Ve Ark., Cloning Of The Human Estrogen Receptor Cdna. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. **82**(23): P. 7889-93.

100. Deroo, B.J. And A.V. Buensuceso, Minireview: Estrogen Receptor-Beta: Mechanistic Insights From Recent Studies. *Mol Endocrinol*, 2010. **24**(9): P. 1703-14.
101. Kuiper, G.G., Et Al, Comparison Of The Ligand Binding Specificity And Transcript Tissue Distribution Of Estrogen Receptors Alpha And Beta. *Endocrinology*, 1997. **138**(3): P. 863-70.
102. Hong, L., A. Colpan, And I.A. Peptan, Modulations Of 17-Beta Estradiol On Osteogenic And Adipogenic Differentiations Of Human Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng*, 2006. **12**(10): P. 2747-53.
103. Hong, S.H., Ve Ark., Expression Of Estrogen Receptor-Alpha And -Beta, Glucocorticoid Receptor, And Progesterone Receptor Genes İn Human Embryonic Stem Cells And Embryoid Bodies. *Mol Cells*, 2004. **18**(3): P. 320-5.
104. Hamada, H., Ve Ark., Estrogen Receptors Alpha And Beta Mediate Contribution Of Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cells To Functional Recovery After Myocardial İnfarction. *Circulation*, 2006. **114**(21): P. 2261-70. 71
105. Han, H.J., J.S. Heo, And Y.J. Lee, Estradiol-17beta Stimulates Proliferation Of Mouse Embryonic Stem Cells: İnvolvement Of Mapks And Cdks As Well As Protooncogenes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006. **290**(4): P. C1067-75.
106. Wang, Q., ve ark., Temporal Expression of Estrogen Receptor Alpha In Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Bioch Biophys Res Commun*, 2006. **347**(1): P. 117-23.
107. Antibiyotikli kemik çimentosunun mekanik dayanımı: Cemex kemik' çimentosu, teikoplanin ve tobramisin İle biyomekanik çalışma S, Bora Göksan, Nadir Şener, i. Remzi Tözün, M. Alp Göksan
108. Göğüş A. ve arkadaşları, Mechanical strength of antibiotic-impregnated bone cement on Day 0 and Day 15: a biomechanical study with Surgical Simplex P and teicoplanin. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2002;**36**:63-71
109. Busscher H. ve Ark., Gentamicin-loaded bone cement with clindamycin or fusidic acid added: Biofilm formation and antibiotic release *J Biomed Mater Res A*. 2005 May **1**;73(2):165-70
110. Timothy T. Roberts and Andrew J. Rosenbaum, Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics The bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing *Organogenesis* **8**:4, 114–124
111. Goldberg VM, Powell A, Shaffer JW, Zika J, Bos GD, Heiple KG. Bone grafting: role of histocompatibility in transplantation. *J Orthop Res* 1985; **3**:389-404.

112. Kaya-Dagistanli F, Tanriverdi G, Altinok A, Ozyazgan S, Ozturk M. The effects of alpha lipoic acid on liver cells damages and apoptosis induced by polyunsaturated fatty acids. *Food Chem Toxicol*. 2013 Mar; 53:84-93.
113. Tanriverdi G., Resveratrol can prevent CCl₄-induced liver injury by inhibiting Notch signaling pathway. *Histol Histopathol*. 2016 Jul;31(7):769-84.
114. Huo MH, Troiano NW, Pelker RR, Gundberg CM, Friedlaender GE. The influence of ibuprofen on fracture repair: biomechanical, biochemical, histologic, and histomorphometric parameters in rats. *J Orthop Res* 1991; 9:383-90.
115. Seckin AS., Doxorubicin induced nephrotoxicity: protective effect of nicotinamide. *Int J Cell Biol*. 2011;2011:390238
116. Burgess E, M.M., Hollinger JO *Bone grafting and substitutes*, in *Plastic Surgery: operations, indications, outcomes*, E.E. Achauer B, editors, Editor 2000, CV Mosby: New York. p. 657-72.
117. Kim, B.C., ve ark., *Mandibular reconstruction with vascularized osseous free flaps: a review of the literature*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012. **13**(2): p. 553-38.
118. Mauffrey, C., et al., Masquelet technique for the treatment of segmental bone loss have we made any progress? *Injury*, 2016. **47**(10): p. 2051-2052.
119. Harrison LJ, Cunningham JL, Strömberg L, Goodship AE. Controlled induction of a pseudarthrosis: a study using a rodent model. *J Orthop Trauma* 2003;17:11-21
120. Poser L., A Standardized Critical Size Defect Model in Normal and Osteoporotic Rats to Evaluate Bone Tissue Engineered Constructs BioMed Research International
121. Aho OM. Ve ark, The mechanism of action of induced membranes in bone repair, *The Journal of Bone and Joint Surgery. American*, vol. 95, no. 7, pp. 597–604, 2013.
122. Iwaniec, U.T., T.J. Wronski, and R.T. Turner, *Histological analysis of bone*, in *Alcohol*. 2008, Springer. p. 325-341
123. Kulak, C.A.M. and D.W. Dempster, Bone histomorphometry: a concise review for endocrinologists and clinicians. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 2010. **54**(2): p. 87-98.
124. Lindsay R, et al. 1976 Long-term prevention of postmenopausal osteoporosis by oestrogen. Evidence for an increased bone mass after delayed onset of oestrogen treatment. *Lancet* **1** 1038–1041.
125. Lindberg MK, et al. 2002b Estrogen receptor specificity for the effects of estrogen in ovariectomized mice. *Journal of Endocrinology* **174** 167–178.

126. Vanderschueren D, et al. 2014 Sex steroid actions in male bone. *Endocrine Reviews* **35** 906–960.
127. Slemenda CW, et al. 1997 Sex steroids and bone mass in older men. Positive associations with serum estrogens and negative associations with androgens. *Journal of Clinical Investigation* **100** 1755–1759
128. Mellstrom D., et al. 2008 Older men with low serum estradiol and high serum SHBG have an increased risk of fractures. *Journal of Bone and Mineral Research* **23** 1552–1560.
129. Khosla S 2013 Pathogenesis of age-related bone loss in humans. *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* **68** 1226–1235.
130. Manolagas SC, O'Brien CA & Almeida M 2013 The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. *Nature Reviews Endocrinology* **9** 699–712
131. Farman HH. et al, Extra-nuclear effects of estrogen on cortical bone in males require ER α AF-1, *Journal of Molecular Endocrinology*, *Extra-nuclear estrogen effects on male bone* 58:2, 105–111
132. Masquelet AC. Induced Membrane Technique: Pearls and Pitfalls. *J Orthop Trauma* 2017;31 Suppl 5:S36–8.
133. Mauffrey, C., et al Reconstruction of Long Bone Infections Using the Induced Membrane Technique: Tips and Tricks, *J Orthop Trauma* Volume 30, Number 6, (2016)
134. Mauffrey, C., et al, Masquelet technique for the treatment of segmental bone loss have we made any progress? *Injury, Int. J. Care Injured* 47 (2016) 2051–2052
135. Weber FA, Lautenbach EE. Revision of infected total hip arthroplasty. *Clin Orthop* 1986;211:108 –115
136. Atkins B, Gottlieb T. Fusidic acid in bone and joint infections. *Int J Antimicrob Agents* 1999;12(Suppl 2):S79 –S93
137. Beeching NJ, Thomas MG, Roberts S, Lang SD. Comparative *in vitro* activity of antibiotics incorporated in acrylic bone cement. *J Antimicrob Chemother* 1986;17:173–184
138. Neut D. Et al, Gentamicin-loaded bone cement with clindamycin or fusidic acid added: Biofilm formation and antibiotic release, *J Biomed Mater Res A*. 2005 May 1;73(2):165-70.
139. Sule O. et al., Fusidic acid-resistant *Staphylococcus aureus* (FRSA) carriage in patients with atopic eczema and pattern of prior topical fusidic acid use. *Int J Antimicrob Agents* 2007;30:78–82

140. Mackey D, Varlet A, Debeaumont D. Antibiotic loaded plaster of Paris pellets: an in vitro study of a possible method of local antibiotic therapy in bone infection. Clin Orthop 1982;167:263–8.
141. Mousset B, Benoit MA, Delloye C, Bouillet R, Gillard J. Biodegradable implants for potential use in bone infection: an in vitro study of antibiotic-loaded calcium sulphate. Int Orthop 1995;19:157–61.
142. Varlet A, Dauchy P, Hingrez M. Osteogenesis induced by the addition of demineralized bone matrix to plaster pellets with antibiotics. Animal experiment. Rev Chir Orthop 1985;71:73–8.
143. Chang Y., et al, *In Vitro* Activities of Daptomycin, Vancomycin, and Teicoplanin Loaded PMMA against Methicillin-Susceptible, Methicillin-Resistant, and Vancomycin-Intermediate Strains of *Staphylococcus aureus*, Antimicrobial Agents And Chemotherapy, Dec. 2011, P. 5480–5484 Vol. 55, No. 12
144. Zhiyu W., Clinical Effects Of Antibiotic-Impregnated Cement On The Treatment Of Traumatic Shinbone Osteomyelitis. Acta Medica Mediterranea, 2018, 34: 1101
145. Giannoudis PV., Restoration of long bone defects treated with the induced membrane technique: protocol and outcomes. Injury, Int. J. Care Injured 47S6 (2016) S53–S61
146. Azi, ML., Membrane Induced Osteogenesis in the Management of Post-traumatic Bone Defects Journal of Orthopaedic Trauma