

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI



***İN VİVO STAPHYLOCOCCUS AUREUS* KAYNAKLI
OSTEOMİYELİT MODELİNDE HESPERİDİN'İN
BİYOETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
HALİL İSMAİL ÖNAL

Danışman
Dr. Öğr. Üy. Ziya YURTAL

HATAY – 2022

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

***İN VİVO STAPHYLOCOCCUS AUREUS* KAYNAKLI
OSTEOMİYELİT MODELİNDE HESPERİDİN'İN
BİYOETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
HALİL İSMAİL ÖNAL

Danışman

Dr. Öğr. Üy. Ziya YURTAL

Bu tez, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
Birimi tarafından 21.YL.052 no'lu proje ile desteklenmiştir.

HATAY – 2022

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
CERRAHİ (VET) ANABİLİM DALI

**İN VİVO STAPHYLOCOCCUS AUREUS KAYNAKLI OSTEOMİYELIT
MODELİNDE HESPERİDİN'İN BİYOETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi
Halil İsmail ÖNAL

Bu tez, aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 31.10.2022 tarihinde yapılan tez savunma sınavında oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi: Jüri Başkanı: Prof. Dr. Muhammed Enes ALTUĞ
Üye: Prof. Dr. Ramazan GÖNENCİ
Üye: Dr. Öğr. Üyesi Ziya YURTAL

Bu tez, Enstitümüz Cerrahi (Vet) Anabilim dalında hazırlanmıştır.

Prof. Dr. İbrahim Halil ÇERÇİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamın planlanması, uygulanması ve tamamlanması sürecindeki katkılarından dolayı danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi ZİYA YURTAL'a, yüksek lisans tez sürecimde hem akademik hem de mesleki tecrübelerinden faydalandığım Sayın Prof. Dr. Muhammed Enes ALTUĞ, Sayın Prof. Dr. Ramazan GÖNENCİ ve Sayın Doç. Dr. Cafer Tayer İŞLER'e, çalışmamda özverili yaklaşımları ile bana her türlü desteğini sağlayan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Zeki DEVECİ'ye, Sayın Dr. Öğr. Üyesi İbrahim ALAKUŞ'a, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ömer KIRGIZ'a, Sayın Öğr. Gör. Dr. Halil ALAKUŞ'a ve çalışmanın deneysel aşamasına katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Özkan ASLANTAŞ'a, biyokimyasal analizlerde katkı sağlayan Sayın Doç. Dr. Altuğ KÜÇÜKGÜL'e, verilerin istatistiğine katkı sağlayan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ufuk KAYA'ya, histopatolojik incelemeleri yapan Sayın Doç. Dr. İlke Evrim SEÇİNTİ'ye ve üniversitemizde desteklerini hissettiğim tüm akademik ve idari çalışanlara teşekkürlerimi arz ederim.

Hayatım boyunca beni destekleyen, haklarını asla ödeyemeyeceğim canım anneme, babama, abilerime, ablam Mesude Zekiye ÖNAL'a, eşim Hatice ÖNAL'a ve bitanecik çocuklarıma sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ÖZET	X
ABSTRACT.....	XI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tarihçe.....	4
2.2. Kemğin Fizyo-Anatomisi	4
2.3. Osteomiyelit	5
2.4. Hastalığın mekanizması	6
2.5. Patogenez.....	6
2.6. Hastalığın sınıflandırılması	7
2.6.1. Hastalığın süresine göre sınıflandırılması	8
2.6.1.1. Akut osteomiyelit	8
2.6.1.2. Kronik osteomiyelit.....	9
2.7. Laboratuvar	10
2.8. Mikrobiyoloji ve Histopatoloji	10
2.9. Radyolojik Bulgular	11
2.10. Tedavi.....	12
2.11. Staphylococcus aureus	13
2.12. NF-κB.....	14
2.13. Nrf-2	14
2.14. TAS/TOS (Total Antioksidan Seviye/Total Oksidan Seviye)	15
2.15. Hesperidin	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3.1. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması.....	17
3.2. Enfeksiyon Oluşturma Prosedürü.....	17
3.3. Radyografik Değerlendirme	18
3.4. Histopatolojik Değerlendirme	19
3.5. Biyokimyasal Değerlendirme.....	20
3.5.1. Dokulardan Lizat ve Protein Örneklerinin Hazırlanması.....	20
3.5.2. Protein Düzeylerinin Araştırılması.....	20
3.5.3. Oksidatif Stres İndeksinin Araştırılması	21
3.6. İstatistiksel Analizler	21
4. BULGULAR.....	22
4.1. Histopatolojik Bulgular	22
4.2. Biyokimyasal Bulgular.....	30
4.2.1. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ=TOS/TAS).....	30
4.2.2. Nrf-2	31
4.2.3. NF-κB.....	32
4.3. Radyografik Bulgular	33
5. TARTIŞMA	35

6. SONUÇ	40
7. KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	46



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Enfeksiyon oluşturma presedürü	18
Şekil 4.1. Kontrol grubuna ait kesitte olağan morfolojide kas dokusu (M), periost (ok işareti), kemik dokusu (yıldız işareti), kemik iliği mesafesi (BM) izlenmektedir. İnflamasyon veya nekroz bulunmamaktadır. H&Ex100.	23
Şekil 4.2. Sham grubuna ait kesitte olağan morfolojide kas dokusu (M), periost (ok işareti), kemik dokusu (yıldız işareti), kemik iliği mesafesi (BM) izlenmektedir. İnflamasyon veya nekroz bulunmamaktadır. H&Ex100.	24
Şekil 4.3. Osteomiyelit grubuna ait kesitte kortikal apse oluşumları (ok işaretleri) ve sekestre kemik (yıldız işareti) görünmektedir. H&Ex100.	25
Şekil 4.4. Osteomiyelit grubuna ait kesitte intramedüller alanda yaygın aktif kronik inflamasyon ve apse oluşumları (yıldız işaretleri) izlenmektedir. H&Ex100.	26
Şekil 4.5. Osteomiyelit grubuna ait kesitte ekstraperiosteal yumuşak dokuda yoğun aktif kronik inflamasyon ve fistül oluşumu (uzun ok işaretleri) görülmektedir. (Kısa ok: periost, yıldız: kemik, BM: kemik iliği mesafesi). H&Ex40.	27
Şekil 4.6. Tedavi grubuna ait kesitlerde apse formasyonu olmaksızın orta/şiddetli düzeyde aktif kronik inflamasyon (ok işaretleri) izlenmektedir. Apse formasyonu veya kemik nekrozu görülmemektedir. (Yıldız: kemik dokusu), BM: kemik iliği mesafesi). H&Ex100.	28
Şekil 4.7. Tedavi grubuna ait başka bir deneğe ait kesitlerde ise dokular olağan morfolojiye çok yakın görünmekte olup sadece hafif düzeyde subperiosteal inflamasyon (uzun ok işareti) ve çevre kas dokusunda hafif düzeyde inflamasyon (kısa ok işareti) izlenmektedir. Apse formasyonu veya kemik nekrozu görülmemektedir. (Yıldız: kemik, BM: kemik iliği mesafesi). H&Ex100.	29
Şekil 4.8. Denemeler sonrası OSİ değerleri.	31
Şekil 4.9. Nrf-2 transkripsiyon düzeyleri	32
Şekil 4.10. NF-κB protein düzeyleri.	32
Şekil 4.11. Kontrol, Sham, Osteomiyelit ve Tedavi grubunun radyografik bulguları.	34

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Osteomiyelitin Cierny ve Mader sınıflandırması	8
Çizelge 3.1. Radyografik değerlendirme	19
Çizelge 3.2. Histolojik parametreler ve skarlama sistemi	19
Çizelge 4.1. Histopatolojik bulguların istatistiksel verileri	29
Çizelge 4.2. Deney gruplarında yer alan ratların radyografik skarlamaı	33



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	:	Santigrad
BT	:	Bilgisayarlı Tomografi
CFU	:	Koloni oluşturan birim (colony forming units)
COX-2	:	siklooksijenaz-2
CRP	:	C-reaktif protein
ELİSA	:	Enzyme-linked immuno sorbent assay
HBO	:	Hiperbarik oksijen tedavisi
HSP	:	Hesperidin
HSP+OM	:	Hesperidin+osteomiyelit
IL 1-β	:	İnterlökin 1-beta
IL-1	:	İnterlökin-1
IL-6	:	İnterlökin-6
IL-8	:	İnterlökin-8
IL-10	:	İnterlökin-10
İAİ	:	İntraosseöz akut inflamasyon
İKİ	:	İntraosseöz kronik inflamasyon
iNOS	:	Nitrik oksit sentaz
ip	:	İntraperitoneal
Keap1	:	Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1
KN	:	Kemik nekrozu
kV	:	Kilovolt
MAPK	:	Mitojenle aktive edilmiş protein kinazlar
MIP-2	:	Makrofaj inflamatuvar protein-2
MRG	:	Manyetik rezonans görüntüleme
mAs	:	Miliamper saniye
mRNA	:	Mesajcı ribonükleik asit
NF-κB	:	Nükleer faktör kappa B
NO	:	Nitrik oksit
Nrf-2	:	Nükleer eritroid ilişkili faktör 2
OM	:	Osteomiyelit
OSİ	:	Oksidatif stres indeksi
PBS	:	Phosphate buffered saline
PET	:	Pozitron emisyon tomografisi
PI	:	Periosteal inflamasyon
RNS	:	Reaktif nitrojen türleri
ROM	:	Reaktif oksijen metabolitleri
ROS	:	Reaktif oksijen türlerinin
S. aureus	:	Staphylococcus aureus

SR	:	Serbest radikaller
TAS	:	Total antioksidan seviyesi
TGF- β	:	Dönüştürücü büyüme faktör β
TNF- α	:	Tümör nekroz faktör-alfa
TOS	:	Total oksidan seviyesi
WBC	:	Beyaz kan hücresi



ÖZET

***In Vivo Staphylococcus Aureus* Kaynaklı Osteomiyelit Modelinde Hesperidin'in Biyoetkinliğinin Araştırılması**

Osteomiyelit, tedavisi güç ve ciddi sosyoekonomik problemlere neden olan kemik sağlığını ilgilendiren önemli bir hastalıktır. Çalışmada, in vivo *Staphylococcus aureus* ilişkili osteomiyelit modelinde hesperidinin biyo-etkinliğinin ortaya konulması amaçlandı.

Çalışmada 28 adet Erkek Wistar Albino ratlar, rastgele 4 eşit gruba ayrıldı (n=7). Gruplar, Grup 1: Kontrol grubu, Grup 2: Sham grubu, Grup 3: Osteomiyelit grubu, Grup 4: Tedavi grubu (Hesperidin+Osteomiyelit) olarak belirlendi. Çalışmada tibial osteomiyelit, tibial krestten açılan bir delikten araşidonik asit ve 1×10^6 CFU⁻¹ bakteri süspansiyonu verilerek oluşturuldu. Tedavi grubundaki ratlara 28 gün boyunca günde 1 kez hesperidin oral gavaj yolla içirildi. Uygulama sonunda tedavinin etkinliği radyografik, biyokimyasal ve histopatolojik olarak değerlendirildi.

Histopatolojik olarak intraosseöz akut inflamasyon, intraosseöz kronik inflamasyon, periosteal elevasyon ve kemik nekrozunun ortalama skorları alınarak değerlendirildi. Kontrol grubunda skor 0, sham grubunda 0-2, osteomiyelit grubunda 9-14, tedavi grubunda ise 2-6 arasındaydı. Biyokimyasal olarak, osteomiyelit deneme modelinde oksidatif stres anlamlı düzeyde artmış bununla birlikte tedavi amacıyla kullanılan hesperidin uygulanan grupta oksidatif stres anlamlı düzeyde azaldı. Nrf-2 translasyon düzeyleri sham grubunda kontrol grubuna göre % 0,2 oranında artarken, OM grubunda % 26 oranında azaldı, bununla birlikte bu değer, tedavi grubunda osteomiyelit grubuna göre % 42 oranında arttı. NF-κB translasyon düzeyleri sham ve OM gruplarında kontrol grubuna göre sırasıyla % 6 ve % 21 oranında arttı. Bununla birlikte bu değer tedavi grubunda osteomiyelit grubuna göre % 9 oranında azaldı. Radyografik olarak, OM grubu, sham ve kontrol grubu ile kıyaslandığında bileşik skor arttı.

Sonuç olarak; Hesperidinin inflamatuvar yollarda rol alan NF-κB'yi baskılayarak antiinflamatuvar, Nrf-2'yi artırarak ise antioksidan etkinlik gösterdi. Aynı zamanda histomorfolojik bulgulara hesperidinin antiinflamatuvar etkinlik gösterdiği de görüldü. Tüm bu bulguların ışığında hesperidinin osteomiyelit tedavisinde potansiyel bir tedavi edici veya hali hazırda tedaviye katkı sağlayabilecek bir ajan olarak kullanılabileceği söylenebilir. Ancak konunun tam aydınlatılabilmesi için daha ileri yöntemlerle araştırmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

Anahtar kelimeler: Hesperidin, Nrf-2, NF-κB, Osteomiyelit, Rat

ABSTRACT

Investigation Of The Bioactivity Of Hesperidin In An *In Vivo* *Staphylococcus Aureus*-Induced Osteomyelitis Model

Osteomyelitis is an important disease related to bone health, which is difficult to treat and causes serious socioeconomic problems. In this study, it was aimed to reveal the bioactivity of hesperidin in an *in vivo Staphylococcus aureus*-associated osteomyelitis model.

In the study, 28 male Wistar Albino rats were randomly divided into 4 equal groups (n=7). Groups were determined as Group 1: Control group, Group 2: Sham group, Group 3: Osteomyelitis group, Group 4: Treatment group (Hesperidin+Osteomyelitis). In the study, tibial osteomyelitis was created by administering arachidonic acid and $1 \times 10^6 \text{CFU}^{-1}$ bacterial suspension through a hole drilled from the tibial crest. The rats in the treatment group were given hesperidin once a day by oral gavage for 28 days. At the end of the application, the effectiveness of the treatment was evaluated radiographically, biochemically and histopathologically.

The mean scores of intraosseous acute inflammation, intraosseous chronic inflammation, periosteal elevation and bone necrosis were evaluated histopathologically. The score was 0 in the control group, 0-2 in the sham group, 9-14 in the osteomyelitis group, and 2-6 in the treatment group. Biochemically, oxidative stress increased significantly in the osteomyelitis trial model, however, oxidative stress was significantly reduced in the hesperidin group used for treatment. Nrf-2 translation levels increased by 0.2% in the sham group compared to the control group and decreased by 26% in the OM group, however, this value increased by 42% in the treatment group compared to the osteomyelitis group. NF- κ B translation levels increased by 6% and 21% in the sham and OM groups compared to the control group, respectively. However, this value decreased by 9% in the treatment group compared to the osteomyelitis group. Radiographically, the composite score increased in the OM group compared with the sham and control groups.

As a result; Hesperidin showed anti-inflammatory activity by suppressing NF- κ B, which plays a role in inflammatory pathways, and antioxidant activity by increasing Nrf-2. At the same time, it was seen that hesperidin showed anti-inflammatory activity in histomorphological findings. In the light of all these findings, it can be said that hesperidin can be used as a potential therapeutic agent in the treatment of osteomyelitis or as an agent that can contribute to the treatment at present. However, further research is needed to fully elucidate the issue.

Keywords: Hesperidin, Nrf-2, NF- κ B, Osteomyelitis, Rat

1. GİRİŞ

Osteomiyelit (OM), 1844 yılında Nelaton tarafından tanımlanmıştır ve literatürde rapor edilen en eski hastalıklardan biri olarak kabul edilmektedir (Lima ve ark. 2014). Osteomiyelit, kronik olarak seyredebilen, kalıcı aşamaya kadar ilerleyebilen, inflamatuvar yıkım, nekroz ve kemik deformasyonu ile sonuçlanan progresif bir enfeksiyondur. Hastalığın oluşumunda, başta piyogen mikroorganizmalar olmak üzere mikobakterilerin ve mantarların da etkili olduğu bildirilmiştir (Mustafa ve ark. 2014). Gram pozitif bir bakteri olan *Staphylococcus aureus* (S. aureus), osteomiyelit enfeksiyonları içinde en yaygın izole edilen bakteridir (Zhang ve ark. 2021). S. aureus kaynaklı osteomiyelit, nüks oranlarının yüksekliği ve tedavi başarısızlığı nedeniyle tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Sadece hastalık boyutunda kalmayıp, etkilenen ekstremitenin amputé edildiği, hatta ölümlerle bile sonuçlanabileceği de belirtilmiştir (Alt ve Giannoudis 2019). Hastalığın tedavisinde antibiyotik kullanımına rağmen kemik enfeksiyonlarının çok zor iyileşmesi veya hiç iyileşmemesi, operatif tedaviden ise istenilen neticenin bir türlü alınamaması sosyoekonomik problemleri beraberinde getirmektedir (Efsthopoulos ve ark. 2008).

Osteomiyelitin tedavisinde en akılcı stratejinin belirlenmesi için hastalığın patofizyolojisinde rol oynayan faktörlerin ortaya konulması ve onların eliminasyonu oldukça önemlidir (Birt ve ark. 2017). Bunun için birkaç sınıflandırma şeması önerilmiştir, ancak bunlardan en çok kabul göreni Waldvoget ve arkadaşlarının sınıflandırmasıdır (Waldvoget ve ark. 1970, Mustafa ve ark. 2014). Bu sınıflandırmanın ilki bakterilerin hematogen olarak yayılması ikincisi ise enfeksiyonun kontakt olduğu şeklindedir. Buna göre kontaminasyon açık kırıklardan veya ortopedik replasman cerrahisi sonucu bir bölgeden yayılmaktadır. Üçüncüsü ise vasküler veya nörolojik yetmezlikle ilişkili osteomiyelittir ve bu durum genellikle kan kaynağının zayıf olmasından, diyabetik yaralardan, his kayıplarından ve bağışıklık sistemindeki değişikliklerden kaynaklanmaktadır (Lew ve Waldvogel 2004, Mustafa ve ark. 2014, Birt ve ark. 2017).

Osteomiyeliti olan insanlarda ve hayvanlarda, yumuşak doku şişliği, ciddi topallık, lokal ağrı ve kemik lezyonları dikkat çeker. Genellikle ortopedik cerrahi veya ısırik yarası gibi

başka bir kemik travması öyküsü vardır. Olgularda lokal lenfadenopati, ateş, depresyon ve iştahsızlık görülebilir (May 2002).

Her osteomiyelitin farklı klinik ve operatif tedavi protokolleri vardır. En sık görülen kemik enfeksiyonları sekonder osteomiyelittir ve travma sonrası veya ameliyata bağlı kontaminasyon sonucu şekillenir. Bunu damarlaşmanın yetersizliğine bağlı osteomiyelit ve kan dolaşımından kaynaklanan enfeksiyonlar izler (Lew ve Waldvogel 2004, Mustafa ve ark. 2014). Son on yılda ise bakterinin doğrudan inoküle olduğu kemik enfeksiyonları artmıştır. Bunun olası nedenleri arasında trafik kazaları ile ortopedik protezlerin kullanımındaki artışlar yer almaktadır (Schmidt ve Swiontkowski 2000, Mustafa ve ark. 2014). Normal kemik dokusu, enfeksiyonlara karşı oldukça dirençlidir. Deneysel modellerde, osteomiyeliti indüklemek için genellikle büyük bir bakteri inokülasyonu gerekir. Bakteriler, osteomiyelitin gelişmesine ve kronikleşmesine katkı sağlayan, kemiğe tutunmayı kolaylaştıran *adhezin* adı verilen proteinlere ve bakterileri antimikrobiyal ajanlardan koruyan ve *biofilm* adı verilen çeşitli virülans faktörlerine sahiptirler (Lew ve Waldvogel 2004, Fritz ve McDonald 2008). Bununla birlikte, konağın enfeksiyona karşı immun yanıtı kemiğe zarar verebilir. Bazı sitokinler, osteolitik özelliklere sahiptir ve fagositler, konakçı hücrelere zarar verebilecek toksik oksijen radikalleri ve proteolitik enzimleri üretir. Oluşan inflamatuvar yanıt, kan akışını bozar ve intraosseöz basıncı artırır. Bu da iskemik nekroza yol açar. *Sekestrum* olarak bilinen bu ölü kemik doku, biyofilm bağlanması için canlı olmayan bir yüzey görevi görebilir ve bakterilerin tutunmasına olanak sağlar. Böyle bir durumda antimikrobiyal ajanların ve konakçı bağışıklık hücrelerinin bakterilere erişmesi zor hale gelir (Fritz ve McDonald 2008).

Nötrofiller, birçok bakteriyel enfeksiyona karşı konakçı immün savunmasında ilk aşamadır ve OM'in patogenezinde çok önemli bir rol oynarlar. OM şekillendiğinde dolaşımdaki nötrofil sayısı artar ve bakterilerle birlikte kemik enfeksiyonunun şekillendiği alanda birikirler. Bu hastalarda inflamatuvar sitokinlerin seviyeleri yükselmiştir. İnterlökin 1 (IL-1) ve tümör nekroz faktörü (TNF- α) gibi pro-inflamatuvar sitokinler, nitrik oksit sentazın (iNOS veya iNOS-2) indüklenebilir izoformunun aktivasyonuna neden olur ve kemik kaybı bu yoldan türetilen nitrik oksit (NO)'i uyarır. Ayrıca bakteri varlığında, daha fazla endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS veya eNOS-3) aktivitesi nedeniyle NO üretimi artar. NO, oksidatif strese yol açan lipidlere ve proteinlere zarar veren reaktif oksijen türlerinin (ROS) artmasına neden olur. İndüklenebilir ve endotelial NO, kemik rezorpsiyonunu artırarak kemik kaybına

neden olur ve OM'in bir özelliği olan osteolizden sorumlu olabilir (Ralston ve ark. 1995, Van't Hof ve ark. 2001, Asensi ve ark. 2007, Jyoti ve ark. 2015). Osteomiyelit oluşturulan ratlardan elde edilen homojenatlarda erken dönemde (1.gün) interlökin 1-beta (IL 1-β), makrofaj inflamatuvar protein-2 (MIP-2) ve interlökin-10 (IL-10)'un yükseldiği bilinmektedir (Sethi ve ark. 2015, Lovati ve ark. 2016, Birt ve ark. 2017). Nükleer faktör kappa B (NF-κB) doğuştan gelen bağışıklık tepkisindeki rolü ile iyi bilinen, tüm hücrelerde bulunan bir transkripsiyon faktörüdür. NF-κB, inflamatuvar sitokinler gibi aracılardan bir transkripsiyonel aktivatörüdür (Nennig ve Schank 2017). Nükleer eritroid ilişkili faktör 2 (Nrf2) aktivasyonu özellikle kronik inflamasyonda, oksidatif/nitrozatif stres üyelerinin detoksifiye edilmesi için antioksidan enzimlerin seviyelerini artırır (Nabavi ve ark. 2016).

Flavonoidler bitkisel bileşiklerdir ve hidroksil, superoksit, alkoksil, peroksil ve nitrik oksit radikallerini temizlerler. Lipooksijenaz, siklooksijenaz ve fosfolipaz-A enzimlerini inhibe ederek antiinflamatuvar etkinlik gösterirler. Ayrıca glutatyon redüktaz, NADH-oksidad (nikotinamid adenin dinükleotit), protein kinaz ve ksantin oksidad gibi birtakım enzimleri inhibe ettikleri de bildirilmiştir (Çimen 1999). Hesperidin (HSP), ilk olarak 1828 yılında Fransız bir kimyacı olan Lebreton tarafından narenciye kabuğunun beyaz iç katmanından izole edilmiştir (Lebreton 1828). Hesperidin diğer flavonoidler ile karşılaştırıldığında antioksidan özelliği ile öne çıkmaktadır (Kuntic ve ark. 2014). Birer narenciye türü olan limon ve tatlı portakalda bol miktarda bulunur (Carballo-Villalobos ve ark. 2016). Plazmada, içirildikten 2 saat sonra pik düzeye ulaşır (Çimen 1999). Farmakolojik olarak; antikarsinojenik, antihipertansif (Polat ve ark. 2016), immünmodülatör (Rezaeyan ve ark. 2016), antiinflamatuvar, güçlü antioksidan (Banji ve ark. 2014, Carballo-Villalobos ve ark. 2016, Yurtal ve ark. 2020), antiallerjenik, nöroprotektif, antimikrobiyal, hipolipidemik, vazodilatör, antihiperkolesterolemik (Subramanian ve ark. 2015), ultraviyole ve radyasyondan koruma (Kuntic ve ark. 2014), hepatoprotektif (Banji ve ark. 2014), östrojenik (Çimen 1999), analjezik ve sedatif gibi özellikleri vardır (Carballo-Villalobos ve ark. 2016). Tüm bu bilgilerin ışığında oluşturulan deneysel modelde tedavi ve hastalığın önlenmesi amacıyla yüksek antioksidan ve antiinflamatuvar özelliği bilinen hesperidin kullanıldı.

Mevcut çalışmada, ratlarda deneysel olarak oluşturulan stafilokokla ilişkili osteomiyelitlerde yüksek antioksidatif ve antiinflamatuvar özelliklere sahip olan hesperidinin terapötik etkisi araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Osteomiyelit, kemik ve kemik iliğinin enfeksiyonudur. Hematojen osteomiyelit, vertebral osteomiyelit, posttravmatik osteomiyelit ve diyabetik ayak enfeksiyonu dahil olmak üzere birçok çeşidi vardır. Osteomiyelit, yüz milyonlarca yıl önce hayvan fosillerinde rastlanmış olan bir hastalıktır. İnsan osteomiyelit tanısı ise Hipokrat zamanına kadar uzanır (MÖ 460-370). Akut hematojen osteomiyelit, 1773'de Broomfield tarafından “medullada apse” olarak tanımlanmıştır (Schmitt 2017). “Osteomiyelit” terimi ise ilk olarak 1844 yılında Nelaton tarafından kullanılmıştır (Bryant 1885). Preantibiyotik çağda, osteomiyelitin tedavisi cerrahi debridman ve sekonder iyileşmeye ile oluyordu. 1940'larda penisilinin bulunmasıyla, stafilokokal osteomiyelite bağlı mortalite % 30'dan % 10'a düştü (Lew ve Waldvogel 2004, Schmitt 2017).

2.2. Kemiğin Fizyo-Anatomisi

İskeletin hareketi ve hayati organların muhafazası başta olmak üzere hareket yeteneği sağlamak, kan hücrelerini üretmek ve tekrar kana verilmesini sağlamak, organ hasarı durumlarında tampon madde sağlamak, kalsiyum, fosfor, büyüme faktörleri ve sitokinlerin depo edilmesini sağlar (Bayliss ve ark. 2012, İnsal ve Pişkin 2017). Taze bir kemikte ortalama % 25 su, % 30 organik madde ve % 45 inorganik madde bulunur. Organik matriks kemiği su bazlı solüsyonlarla kaynatılınca jelatine dönüşebilen Tip I Kollajen oluşur. Kollajen olmayan organik maddeler ise glikozaminoglikanlar, glikoproteinler, sitokinler ile dönüştürücü büyüme faktör β ailesi (TGF- β), koloni uyarıcı faktörler, trombosit kaynaklı büyüme faktörü ve diğer büyüme faktörleridir (İnsal ve Pişkin 2017). Kemiğin kuru ağırlığının % 65'ini inorganik matrikstir. Kemiğin mineral içeriğinin önemli bir kısmı hidroksiapatit kristalleridir (Clarke 2008, Buckwalter ve ark. 1995, İnsal ve Pişkin 2017). Kemik, destek hücreleri olan osteoblast ve osteositten ve kemiğin yeniden şekillenmesinden sorumlu olan osteoklasttan oluşur (Kini ve Nandeesh 2012, İnsal ve Pişkin 2017). Kemiğin en temel birimi ise osteondur. Kemiğin uzunlamasına uzanan kanallara “Havers kanalları” denir. Bu kanalların etrafında dairesel olarak yerleşmiş lameller bulunmaktadır. Lameller üzerinde ise lakuna denilen boşluklar vardır ve bu boşluklara osteositler yerleşmektedir. İşte

bu üç yapıdan oluşan sisteme “osteon” veya “Havers sistemi” denmektedir. Havers kanallarının içinde, kan damarları, lenf damarları ve sinirler bulunmaktadır. Kemiğin uzun eksenine dik uzanan damarlar ise Wolkman kanalları denilen boşluklarda yer almaktadır (İnsal ve Pişkin 2017). Anatomik olarak bakıldığında kemikler; periosteum, korteks ve medulladan oluşmaktadır. Periosteum, eklem kıkırdağı hariç kemiklerin dış yüzeylerini çevrelemektedir. Korteks, periostun altında yer almaktadır ve uzun kemiklerin daha fazla yük taşıyan yüzeylerinde yani diyafizinde daha kalındır. Medulla, kemiklerin iç tabakasıdır ve burada kan damarları, sinirler ve kemik iliği vardır. Periosteum, iki farklı katmandan oluşmaktadır. Dışta lifli katman, içte ise hücresel katman vardır. Dış katman, fibroblastlar, kollajen, elastin lifleri ile sinir ve damar ağından oluşur. İçteki hücresel katman ise mikrodamarlar ve sempatik sinirlerle birlikte osteoprogenitör hücreler, fibroblastlar ve osteoblastlardan oluşur (Tzelepi ve ark. 2009).

Tibia, ratlarda ön bacağın yarıçapına eşittir ve arka bacağın ikinci bölümünün ağırlık taşıyan bir bileşenidir. Sıçanlarda, fibula, alt kısmında tibia ile kaynaşmıştır. Tibianın proksimal ucundaki eklem yüzeyi medial ve lateral kondillerin üst yüzeyleri olmak üzere iki içbükey alan içerir ve bunların arasında da interkondiler oluk vardır. Menisküs, oluktaki tibial yüzeye anterior ve posterior olarak sabitlenir. Tibia, lateral ve medial yüzeylerini ayıran bir tepeye sahiptir. Tibianın proksimal ön yüzeyi belirgindir ve patellar ligamentin bağlı olduğu tibial tüberositiyi oluşturur. Fibula'nın proksimal ucu, lateral tibial kondilin çıkıntısının altındaki bir fasette tibia ile eklemlenir (Maynard ve Downes 2019).

2.3. Osteomiyelit

Osteomiyelit, tedavisi en zor bulaşıcı hastalıklardan biri olarak kabul edilir (Sia ve Berbari 2006). Osteomiyelit, enfeksiyöz bir mikroorganizma tarafından oluşturulan ve kemik yıkımı ve sekestra oluşumunun da eşlik ettiği inflamatuvar bir süreçtir (Lew ve Waldvogel 2004, Sia ve Berbari 2006). Enfeksiyon, kemiğin sadece bir kısmında lokalize olabildiği gibi kemik iliği, korteks, periosteum ve kemiği çevreleyen yumuşak dokuları da içerebilir. Lokal osteomiyelit, genellikle travma, kemik cerrahisi veya eklem replasmanı sonucu ortaya çıkar. Her yaşta görülebilir ve herhangi bir kemiği tutabilir. Vasküler yetmezliğe bağlı şekillenen sekonder osteomiyelit, ağırlıklı olarak diyabet hastalığı olan vakalarda görülür. Bu vakalarda predispoze faktörler, kemik ve yumuşak doku iskemisi ile periferik motor, duyuşal ve otonom nöropatisidir. Hematojen osteomiyelit çoğunlukla genç

ve yaşı hastalarda görülür ve kanda bulunan bakteriler tarafından oluşturulur (Lew ve Waldvogel 2004). Erişkinlerde genellikle spesifik olmayan ağrı ve düşük dereceli ateş vardır. Ateş, titreme, lokal şişlik ve bazen de ilgili kemik üzerinde kızarıklık görülür. Bakteriyeminin kaynağı, önemsiz bir deri enfeksiyonu veya daha ciddi bir enfeksiyon olan bakteriyel endokardit olabilir. Osteomyelit varlığının doğrulanması için genellikle radyolojik, mikrobiyolojik ve histopatolojik testler gereklidir (Sia ve Berbari 2006).

2.4. Hastalığın mekanizması

Uzun kemiklerin hematojen osteomyelitinde genellikle metafiz etkilenir. Epifiz plaklarına yakın metafizdeki kan akışının yavaşlaması, mikrobik ajanların birikmesine ve enfeksiyon oluşumuna yol açar. Medüller kemikte artan basınca yol açan bir inflamatuvar yanıt ortaya çıkar. Bu basınç, enfeksiyonun kortekse ve kontrol edilmezse nihayetinde periosttan geçmesine neden olur (Schmitt 2017). İnflamatuvar faktörler ve lökositler doku nekrozunun şekillenmesine, kemik trabeküllerinin ve kemik matriksinin yıkımına katkıda bulunur. Vasküler kanalların inflamatuvar ajanlar tarafından tıkanması iskemiye neden olur ve böylece kemik nekrozu şekillenir (Lew ve Waldvogel 2004). Kan desteği olmayan kemik segmentleri yerinden ayrılabilir ve sekestrum oluşur (Schmitt 2017). Oluşan bu sekestrum antibiyotik tedavisine rağmen bakteri barındırmaya devam edebilir. Antibiyotikler ve inflamatuvar hücreler bu avasküler alana ulaşamaz, bu nedenle osteomyelit tıbbi tedavisi başarısız olur. Enfarktüsün kenarında, artan osteoklastik aktivite ile ilişkili reaktif hiperemi vardır. Osteoklastik aktivite ile, kemik kaybı ve lokalize osteoporoz şekillenir. Bazı durumlarda ise periosteal aktivite ve yeni kemik oluşumu görülebilir. Büyüme faktörlerinin, sitokinlerin, hormonların ve ilaçların; osteoblastların ve osteoklastların proliferasyonunu ve aktivitesini düzenlediği bilinmektedir ve enfeksiyon sırasında lokal konsantrasyonları değişmektedir (Lew ve Waldvogel 2004).

2.5. Patogenezi

Osteomyelit, hematojen yayılım, mikroorganizmaların kemiğe doğrudan inokulasyonu veya çevre dokulardaki bir enfeksiyon odağından kaynaklanabilmekte ve hatta önemsiz bir deri enfeksiyonu bile bakteriyemi kaynağı olabilmektedir. Mikroorganizmaların dokuya direkt inokulasyonu ise genellikle cerrahi girişim esnasında veya penetran travmalar ile ilişkilendirilmektedir (Calhoun ve ark. 2009). Osteomyelit, klinik görünümü ve hastalığın yönetimi açısından heterojen bir hastalıktır (Lew ve Waldvogel 2004). Osteomyelit gelişimi

mikrobiyal etkenler ve konakçı faktörlerle ilişkilidir (Lew ve Waldvogel 2004). Daha çok monobakteriyel etkenler sorumlu tutulur ve patojenik mikroorganizmalar arasında, açık ara en yaygın olanı *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (Calhoun ve ark. 2009) olmakla beraber koagülaz negatif stafilocoklar, aerobik gram negatif bakteriler ve *Peptostreptococcus* spp de sıklıkla izole edilir (Lew ve Waldvogel 2004). *S. Aureus* 'un virölansına katkıda bulunan bir dizi hücre dışı ve hücre ile ilişkili faktör vardır. Birincisi, bakteriyel adezinler olarak adlandırılan hücre dışı matris proteinlerine bağlanmayı destekleyen faktörlerdir (Lew ve Waldvogel 2004). Bu adezinler sayesinde *S. aureus* yapışma yeteneğini kazanır ve konakçı dokulara kolonize olmasına sebep olur (Schmitt 2017). İkinci faktör grubu, protein A, bazı toksinler, kapsüller polisakkaritler sayesinde konak savunmasından kaçmasını sağlar. Üçüncü grubu ise, spesifik olarak eksotoksinleri ile konakçı hücrelere saldırarak veya çeşitli hidrolazlar ile hücre dışı matrisin bileşenlerini parçalayarak istilayı veya doku penetrasyonunu sağlar (Lew ve Waldvogel 2004). *S. aureus*, kültüre edilmiş osteoblast hücreleri içinde hayatta kalabilir ve antimikrobiyallere karşı direnç geliştirir (Schmitt 2017). Bu da kemik enfeksiyonlarının neden kalıcılığını sürdürebildiğini açıklayabilir. *S. aureus* biyofilmler oluşturabilir ve bunun antimikrobiyal ajanlarla tedavisi zordur. Biyofilm bir mikrobiyal topluluktur. Bakteriler, biyofilmlerde küçük kanallar aracılığıyla birbirleriyle iletişim kurarlar. Hücreden hücreye olan bu sinyalleşme sistemine çekirdek algılama denir. Biyofilmler, antimikrobiyal ajanların ve besinlerin penetrasyonunu yavaşlatmak için bir difüzyon bariyeri oluşturabilir (Lew ve Waldvogel 2004).

2.6. Hastalığın sınıflandırılması

Osteomiyelitte yaygın olarak kullanılan Lew-Waldvogel ve Cierny-Mader sınıflandırması olmak üzere iki sınıflandırma sistemi vardır. Lee ve Waldvogel, osteomiyeliti hastalığın süresine (akut ve kronik) ve enfeksiyon mekanizmasına göre sınıflandırmıştır. Bu sınıflandırma etiyolojiye dayalıdır ve spesifik tedavilerin seçiminde kullanılmaz. Cierny ve Mader osteomiyeliti ilgili kemiğin parçasına, konakçının fizyolojik durumuna ve yerel çevreye göre sınıflandırmıştır (Çizelge 2.1). Bu sistem osteomiyelit tedavisi için bir kılavuz olarak kullanılabilir. 1. aşama antibiyotiklerle yeterince tedavi edilebilirken, 2. ila 4. aşamalar genellikle debridman veya ortopedik rekonstrüksiyon gibi daha agresif tedavi gerektirmektedir (Gunawan ve Setiyohadi 2010).

Çizelge 2.1. Osteomyelitin Cierny ve Mader sınıflandırması (Gunawan ve Setiyohadi 2010).

Osteomyelitin Cierny ve Mader sınıflandırması	
Anatomik Tip	
Evre 1: Medüller osteomyelit	Enfeksiyon sadece kemiğin intramedüller yüzeyini içerir, örn. hematogen enfeksiyon ve kemik iliği enfeksiyonunda.
Evre 2: Süperfisyal osteomyelit	Hasarlı yumuşak doku altında nekrotik kemik yüzeyinin maruz kalmasından sonra doğrudan aşılama veya bitişik enfeksiyon odağının neden olduğu gerçek osteomyelit.
Evre 3: Lokalize osteomyelit	Kemik korteksinde kalın sekestra varlığı ile işaretlenmiş; bu, kemik stabilitesini bozmadan cerrahi olarak çıkarılabilir.
Evre 4: Diffuz osteomyelit	Bu aşamada, enfeksiyonu durdurmak için genellikle kemik rezeksiyonu gerekir; kemik debridmandan önce veya sonra stabilitesini kaybedebilir.
Konak fizyolojik durumu	
Sınıf A: Normal konakçılar Sınıf B: Sistemik ve lokal durumlara sahip konakçılar Sınıf C: Tedavinin hastalığın kendisinden daha fazla morbiditeye neden olacağı konakçılar	
Bağıışıklık, metabolizma ve lokal vaskülerizasyonu etkileyen faktörler	
Sistemik faktörler -Malnutrisyon -Böbrek ve karaciğer yetmezliği -Diabetes mellitus -Kronik hipoksi -İmmun hastalık -Malignensi -İleri Yaşlılık -İmmun yetmezlik veya immunsupresif tedavi	Lokal faktörler -Kronik lenfödem -Venöz stazis -Büyük kan damarlarının hastalığı -Arteritis -Küçük kan damarlarının hastalığı -Aşırı skar doku -Radyasyon ilişkili fibrozis -Nöropati

2.6.1. Hastalığın süresine göre sınıflandırılması

2.6.1.1. Akut osteomyelit

Akut osteomyelit, birkaç gün veya hafta içinde gelişir (Lew ve Waldvogel 2004). Akut osteomyelitte ödem, damar tıkanıklığı ve küçük damar trombozunun eşlik ettiği süpüratif bir enfeksiyon tablosu vardır. Erken dönemde, çevredeki yumuşak dokuya yayılan enfeksiyon nedeniyle kemiğin vasküler beslenmesi azalır. Medüller ve periosteal kanlanma tehlikeye girdiğinde ise geniş ölü kemik alanları yani sekestralar oluşabilir (Emslie ve ark.

1983, Calhoun ve ark. 2009). Akut osteomyelit, antibiyotik ve cerrahi girişim ile hızlı ve agresif bir şekilde tedavi edilirse, sekestra oluşumu engellenebilir. Kalıcı enfeksiyonlarda, granülasyon dokusu ve sekestra çevresinde fibröz doku ve kronik inflamatuvar hücreler birikmeye başlar. Enfeksiyon kontrol altına alındıktan sonra vasküler beslemede bir azalma olur bunun sonucunda da inflamatuvar yanıt engellenir (Calhoun ve ark. 2009). Akut osteomyelitte implant kaynaklı bir durum söz konusuysa cerrahi planlanabilir, çünkü erken tanı ve etkili debridman tedavide en etkili yoldur. Postoperatif dönemde cerrahi bölgede ağrı, lokal hiperemi, inflamasyon, seröz eksudat ve hematoma şüphesi olduğunda debridman ve kültür için harekete geçilmelidir (Trebse ve ark. 2005, Lima ve ark. 2014). Akut enfeksiyonda, cerrahi drenaj ve oluşan boşluğun bolca yıkanması, bölgedeki bakteri yükünü önemli ölçüde azaltır. Yıkamada, toplamda 3-9 litre salin solüsyonu kullanılabilir ve kullanılan salin solüsyonunun miktarı ile bakteri yükünün azalması arasında doğrudan bir ilişki vardır. Cansız dokuların çıkarılmasından sonra ölü bir boşluk olduğu durumlarda, lokal salınım için antibiyotik emdirilmiş polimetilmetakrilat çimento kullanımı iyi bir seçenektir (Tetsworth ve Cierny 1999, Svoboda ve ark. 2006, Lima ve ark. 2014).

2.6.1.2. Kronik osteomyelit

Kronik osteomyelit, enfekte, cansız dokuların ve etkisiz konak yanıtının bir arada bulunmasının bir sonucu olarak ortaya çıkar (Ciampolini ve Harding 2000, Calhoun ve ark. 2009). Kronik osteomyelit genellikle kronik ağrı ve drenaj ile kendini gösterir. Ateş varsa, tipik olarak düşük dereceli olarak ifade edilir (Sia ve Berbari 2006). Bakteriler, osteomyelit vakalarında kemik ve prostetik cihazlara yapışık halde bulunmaktadır. Biyofilmler tipik olarak osteomyelit gibi kronik enfeksiyonların dirençli olması ile ilişkilidir (Calhoun ve ark. 2009). Kronik osteomyelitin patolojik özellikleri arasında, nekrotik kemik varlığı, yeni kemik oluşumu ve çok sayıda lenfosit, histiyosit ve bazen plazma hücrelerinin birleştiği polimorfonükleer lökositlerin eksüdasyonu vardır (Ciampolini ve Harding 2000, Calhoun ve ark. 2009). Kronik osteomyelit tedavisinde mikrobiyolojik tanı konulmasının yanında hastanın bağışıklığının iyileştirilmesi, altta yatan hastalıkların stabilizasyonu, kemik tutulumunun doğru anatomik lokalizasyonu, yeterli antimikrobiyal tedavi, tüm cansız dokuların cerrahi debridmanı, yumuşak dokuların onarımı ve kemik rekonstrüksiyonunun yapılması gerekmektedir. Yapılacak ilk iş ise tüm cansız dokuların çıkartılmasıdır (Norden ve ark. 1994, Lima ve ark. 2014). Enfekte bölgede canlılığını sürdüren periosteum ve endosteum parçalarından yeni kemik oluşur ve sekestranın etrafını saran bu canlı kemikten

oluşan kılıfa *involukrum* denir. İnvolukrum düzensizdir ve genellikle pürülan çevredeki yumuşak dokulara doğru ilerleyebilir. İnvolukrumun, yeni bir kemik oluşturmak amacıyla yoğunluğu ve kalınlığı kademeli olarak artabilir. Yeni kemiğin miktarı ve yoğunluğu, kemiğin boyutuna ve enfeksiyonun şiddetine ve süresine göre değişiklik gösterir (haftalar veya aylar sürebilir). Endosteal olarak yeni oluşan kemik medüller kanalı tıkayabilir. Sekestrumun ameliyatla veya konak savunması aracılığıyla çıkarılmasından sonra kalan boşluk, özellikle gençlerde yeni kemik üremesiyle dolabilir. Ancak erişkinlerde kavite kalıcı olabilir veya boşluk, sinüs yolu aracılığıyla deri yüzeyi ile bağlantı kurabilir (Ciampolini ve Harding 2000, Calhoun ve ark. 2009).

2.7. Laboratuvar

Osteomiyelit vakalarında beyaz kan hücresi sayısı (WBC) güvenilir bir gösterge değildir çünkü enfeksiyon varken bile özellikle kronik vakalarda normal olabilmektedir (Lew ve Waldvogel 2004, Sia ve Berbari 2006). Eritrosit sedimentasyon hızı ve herhangi bir enfeksiyona yanıt olarak karaciğer tarafından sentezlenen C-reaktif protein (CRP) konsantrasyonu çoğu osteomiyelit vakasında enfeksiyondan saatler sonra artar ve çoğu vakada tedavi başladıktan sonraki bir hafta içinde normale döner (Sia ve Berbari 2006, Lima ve ark. 2014). CRP, tedaviye yanıtın takibi için daha güvenilirdir (Lima ve ark. 2014). Metastatik veya bazı metabolik kemik hastalıklarında kalsiyum, fosfat ve alkalik fosfat konsantrasyonları yüksektir ancak osteomiyelitte normaldir (Lew ve Waldvogel 2004). Eklem protezi ile ilişkili kemik enfeksiyonlarının tanı aracı olarak serum interlökin-6 (IL-6) seviyesi incelenir (Lima ve ark. 2014).

2.8. Mikrobiyoloji ve Histopatoloji

Osteomiyelitte ilk aşama, uygun antimikrobiyal tedavinin seçilebilmesi için mikrobiyal ajanları izole etmektir (Lew ve Waldvogel 2004, Sia ve Berbari 2006, Lima ve ark. 2014). Osteomiyelit tanısını doğrulamak için kemik, yumuşak doku ve kemik sekestrası örnekleri biyopsi veya cerrahi debridman ile alınarak histolojik analiz için gönderilmektedir (Lima ve ark. 2014). Bu materyaller eğer mümkünse antimikrobiyal bir ajan başlanmadan alınmalıdır (Sia ve Berbari 2006). Kemik biyopsisi lokal veya genel anestezi altında yapılmalıdır. Kemik biyopsileri yapıldığında, numuneler hem aerobik hem de anaerobik olarak çalışılmalıdır (Lew ve Waldvogel 2004). Akut osteomiyelitte polimorfonükleer lökositler, kronik formlarda ise lenfositler, osteoblastlar ve osteoklastlar baskındır (Lima ve ark. 2014). Kemik

biyopsisi kültürü, vakaların % 94'ünde mikrobiyolojik olarak tanı koydurur (Zuluaga ve ark. 2006, Sia ve Berbari 2006). Ancak drenaj yaralarından veya sinüs yollarından alınan sürüntü kültürleri, osteomiyelite neden olan organizmaları öngörmede güvenilir değildir. Ama yine de enfeksiyonu kontrol altına almak için alınan önlemlere rehberlik edebilir (Mackowiak ve ark. 1978, Perry ve ark. 1991, Sia ve Berbari 2006). Şayet yaygın olarak kültüre edilen mikroorganizmalar yoksa ve klinik bulgular ile uyumluysa mikobakteri ve mantar enfeksiyonları açısından da numuneler alınmalı ve çalışılmalıdır. İmplantla ilişkili enfeksiyonlarda, maksimum tanı verimi için, implant çevresinden numuneler alınmalıdır. Cerrahi sırasında frozen kesit olarak alınan doku örneklerinde çok miktarda nötrofil görülmesi enfeksiyon göstergesi olarak kabul edilir. Granülatomatöz lezyonların pozitif Ziehl-Neelsen boyaması ile görüntülenmesi, mikobakteriyel enfeksiyon açısından erken teşhis konulmasını sağlar. Çoğu osteomiyelit tipinde en sık izole edilen mikroorganizma *S. aureus*'dur (Lew ve Waldvogel 2004).

2.9. Radyolojik Bulgular

Kemik enfeksiyonlarında teşhis koyabilmek için çeşitli görüntüleme yöntemleri gerektir. Direkt grafiler ile, yumuşak doku şişkinliği, eklem boşluklarının daralması veya genişlemesi, kemik yıkımı ve periost reaksiyonu tanısı konabilir (Lew ve Waldvogel 2004). Bununla birlikte, enfeksiyondan sonraki ilk 10-21 gün sonrasına kadar direkt grafilerde kemik yıkımı belirgin değildir, ancak enfeksiyonun başlamasından 10-14 gün sonra radyografik anormallikler görülmeye başlar (Lew ve Waldvogel 2004, Sia ve Berbari 2006). Ultrasonografi, akut osteomiyelite erken tanı için veya yumuşak dokuda pürülan yapıda olan koleksiyonun saptanması için faydalı olabilir (Lew ve Waldvogel 2004). Hem Bilgisayarlı Tomografi (BT) hem de Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) mükemmel çözünürlük gücüne sahiptir ve geleneksel radyografiler normal olsa bile medulla yıkımının yanı sıra periosteal reaksiyon, kortikal yıkım, eklem hasarı ve yumuşak doku tutulumunu ortaya çıkarabilir (Lew ve Waldvogel 2004, Sia ve Berbari 2006). BT'de, kemik veya metal varlığında artefaktlar nedeniyle görüntü bozulabilir, ancak yine de iğne biyopsisini yönlendirmek için yararlıdır. Ayrıca BT, kortikal kemiğin tanımını ve çevredeki yumuşak dokuların değerlendirmesini için çok önemlidir. Özellikle sekestraların tanımlanmasında çok faydalıdır. Bununla birlikte, MRG yumuşak doku değerlendirmesi için BT'den daha faydalıdır. MRG ile kemik ödeme erken tanı konulabilir ve bu nedenle enfeksiyonun erken tespiti için en yararlıdır. MRG çok duyarlı olmasına rağmen, kemik iliği ödeminin aylarca

devam etmesi nedeniyle tedaviye yanıtı değerlendirmede fayda sağlamaz (Lew ve Waldvogel 2004). Nükleer kemik taramaları osteomiyelitin tanısını koymada hassastır ancak pahalı bir yöntemdir (Sia ve Berbari 2006). Metilen difosfonat, artmış kemik metabolik aktivitesi bölgelerine bağlanır ve akut osteomiyelitin erken tespitinde oldukça hassastır. Radyoaktif olarak işaretlenmiş kan hücreleri (67galyum sitrat, indiyum-111 veya teknesyum-99m ile işaretlenmiş lökositler) veya spesifik antikorlar ile lökosit taraması enfeksiyonun görüntülenmesi için kullanılabilir (Lew ve Waldvogel 2004, Sia ve Berbari 2006, Yüksel 2021). Osteomiyelit tanısı için pozitron emisyon tomografisi (PET) taraması ile ilgili deneyimler ise sınırlıdır (Sia ve Berbari 2006).

2.10. Tedavi

Osteomiyelit tedavisinde, yeterli drenaj, kapsamlı debridman, ölü boşluğun ortadan kaldırılması, yara bakımı ve kültüre yönelik antibiyotik tedavisinin yapılması gerekir. Bununla beraber bağışıklığı baskılanmış bir hasta ise bağışıklığı aktif hale getirilmeli ve diyet yeniden gözden geçirilmelidir (Calhoun ve ark. 2009). Enfeksiyonun başarılı bir şekilde tedavi edilmesi için cerrahi debridmanın ve spesifik antimikrobiyal tedavinin bir arada uygulanması gerekir. Debridman sonrası oluşan ölü boşlukların doldurulması için vaskülarize ve süngerimsi kemik grefleri kullanılabilir. İskelet stabilitesini sağlamak için ise plak, vida ve/veya eksternal ya da internal fiksasyon gereklidir. Debridman sırasında veya kemik biyopsisi aşamasında mümkünse antimikrobiyaller verilmemelidir. Kültür sonucu çıkana kadar geniş spektrumlu parenteral bir antimikrobiyal ilaç başlanır ve kültür sonucuna göre de tedavi yeniden şekillendirilir (Sia ve Berbari 2006). Osteomiyelitte antimikrobiyal tedavinin ne kadar sürmesi gerektiği tam anlamıyla bilinmemektedir. Ancak, 4-6 haftalık bir parenteral tedavi gerektiği öngörülmektedir (Lew ve Waldvogel 1997, Lew ve Waldvogel 2004, Sia ve Berbari 2006). Bununla beraber debride edilen kemiğin vaskülarize yumuşak doku ile kaplanması 6 hafta kadar sürmektedir. Hastaların çoğunda uzun süreli intravenöz antibiyotikler ile devam edilir. Yine oral olarak florokinolonlar, klindamisin, ko-trimoksazol, metronidazol, flukonazol ve linezolid de kullanılabilir (Sia ve Berbari 2006). Diğer bir tedavi şekli hiperbarik oksijen tedavisi (HBO)'dir. Hiperbarik oksijen tedavisi, dünya çapında altmış yılı aşkın süredir kullanılan bir adjuvan tedavi şeklidir (Calzia ve ark. 2006, Lima ve ark. 2014). Enfeksiyöz, inflamatuvar, immünolojik ve iskemik doku değişiklikleri olan hastalarda kullanılır. Tedavi, hiperbarik koşullar altında, yani hasta basınca dayanıklı bir hiperbarik odaya yerleştirilerek, deniz seviyesindeki atmosferik

basıncın üzerine yapay olarak yükseltilmiş basınçlar altında % 100 oksijen solunmasında ibarettir. Bu ortamda, basınç altında büyük miktarlarda oksijen kana nüfuz eder, plazmada çözülür ve dokulara ulaşır. Doku hiperoksijenasyonu, lökositler tarafından bakteri lizisinin uyarılması, fibroblast ve kollajen proliferasyonunda artış ve iskemik veya ışınlanmış dokuların neovaskülarizasyonu dahil olmak üzere spesifik terapötik etkilere neden olur. HBO'nun immünomodülasyon, proinflamatuvar mediatörlerde azalma ve iskemik dokularda iskemi-reperfüzyon etkilerinde azalma gibi etkileri, enfeksiyonların tedavisinde son derece faydalıdır (Lima ve ark. 2014).

2.11. Staphylococcus aureus

Stafilokokları ilk defa 1878 yılında Robert Koch tanımlanmıştır. 1881 yılında da Alexander Ogston, bu etkenin farelerde hastalığa neden olduğunu bildirmiştir (Yüksekdağ ve Baltacı 2013). Staphylococcus'un 50'den fazla türü bulunmaktadır. Bu bakteriler, sağlıklı insan ve birçok hayvan türünün deri ve mukozalarında bulunurlar ve enfeksiyona neden olmazlar (Grace ve Fetsch 2018, Taylor ve Unakal 2021). Ancak S. aureus dokuların içine veya kan dolaşımına girerse, ciddi enfeksiyonlara neden olabilir. Enfeksiyonlar genelde direkt temas ile oluşmaktadır (Taylor ve Unakal 2021). Staphylococcus aureus, insan ve hayvanlar için önemli bir patojendir. S. aureus popülasyonun yaklaşık % 20'sinin burun deliklerinde bulunur (Foster ve Geoghegan 2015). Staphylococcus aureus, gram pozitif bir bakteridir. Bu patojenin neden olduğu enfeksiyonlar hem toplumda hem de hastane ortamında yaygındır (Taylor ve Unakal 2021). S. aureus biyofilm üretebilir, osteoblastları istila edebilir ve küçük koloni varyantı olarak bilinen hücre içi duruma dönüşerek hücre içinde hayatta kalabilir (de Araujo ve ark. 2021). Katalaz ve koagulaz pozitifdir. Katalaz sayesinde konak savunma mekanizması olan hidrojen peroksidi parçalar ve böylece hücre içinde yaşama şansı bulur. Koagulaz sayesinde ise pıhtılaşmada rol alan fibrinojeni fibrine çevirir (Ondusko ve Nolt 2018). Staphylococcus aureus'lar ortam şartlarına çok dayanıklıdırlar. Özellikle biyofilm tabaka oluşturma özelliği ile kombine olduğunda hastalık yapıcı etkisi oldukça yükselmektedir (Cucarella ve ark. 2001, Yüksekdağ ve Baltacı 2013). Biyofilm, bakteri tarafından üretilen organik bir ekzopolisakkarid matriks ile canlı veya cansız bir yüzeye geri dönüşümsüz olarak yapışmış hâlde yaşayan mikroorganizmalar tarafından oluşturulan bir yapıdır (Nostro ve ark. 2014, Yüksekdağ ve Baltacı 2013). Oluşan bu biyofilm tabakası sayesinde bakteriler antimikrobiyal ajanlardan korunabilmektedirler ve tedavileri de daha zor ve daha uzun sürede olmaktadır (Yüksekdağ ve Baltacı 2013).

2.12. NF-κB

Nükleer faktör-κB (NF-κB), immün ve inflamatuvar yanıtların farklı süreçlerinde yer alan geniş bir gen dizisini düzenleyen, uyarılabilir transkripsiyon faktörleri ailesindendir. Bu aile, NF-κB1 (aynı zamanda p50 olarak da adlandırılır), NF-κB2 (p52 olarak da adlandırılır), RelA (p65 olarak da adlandırılır), RelB ve çeşitli hetero- veya homo-dimerler dahil olmak üzere yapısal olarak ilişkili beş üyeden oluşur. NF-κB proteinleri normalde sitoplazmada, IκB ailesi üyeleri ve ankirin tekrarlarının varlığı ile karakterize edilen ilgili proteinler dahil olmak üzere bir inhibitör protein ailesi tarafından inaktif halde tutulur. Bugüne kadar, en iyi çalışılmış ve en önemli IκB ailesi üyesi IκBα'dır. Ek olarak, NF-κB1 ve NF-κB2, p105 ve p100'ün öncü proteinleri, C-terminal iksirleri IκB'nin yapısına benzediğinden ve NF-κB inhibe edici fonksiyonlara sahip olduğundan, IκB benzeri proteinler olarak hizmet eder. İnflamasyon; vazodilatasyonun, bağışıklık hücrelerinin ve plazma proteinlerinin enfeksiyon veya doku hasarı bölgesine göç etmesi dahil bir dizi reaksiyonun gerçekleştiği, konakçının enfeksiyonlara ve doku hasarlarına karşı koruyucu bir tepkisidir. Normalde, inflamasyon konakçı için faydalıdır. Bununla birlikte, düzensiz inflamatuvar yanıtlar, akut veya kronik inflamatuvar hastalıkların gelişimine katkı sağlayarak aşırı veya uzun süreli doku hasarlarına neden olabilir. NF-κB, proinflamatuvar gen indüksiyonunun merkezi bir aracısıdır ve hem doğuştan gelen hem de adaptif bağışıklık hücrelerinde işlev görür (Liu ve ark. 2017). NF-κB, M1 makrofajlarının önemli bir transkripsiyon faktörüdür ve TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-12p40 ve siklooksijenaz-2'yi (COX-2) kodlayanlar genler dahil olmak üzere çok sayıda inflamatuvar genin indüklenmesi için gereklidir (Wang ve ark. 2014, Liu ve ark. 2017). NF-κB, inflamatuvar süreçlerde ana transkripsiyon faktörlerinin proinflamatuvar ailesinin bir üyesi olarak kabul edilir ve çeşitli uyarılar tarafından indüklenen M1 makrofaj polarizasyonuna katılır (Wang ve ark. 2020).

2.13. Nrf-2

Nükleer eritroid ilişkili faktör 2 (Nrf-2), hücrel antioksidan tepkilerin birincil düzenleyicisi olarak hizmet eden bir transkripsiyon faktörüdür. Devam eden oksidatif stresin yokluğunda normal koşullar altında, Nrf2, Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1 (Keap1) tarafından inaktif bir durumda sitoplazmada muhafaza edilir. Bununla birlikte, oksidatif stres meydana geldiğinde, Nrf2 Keap1'den ayrışır ve aktive olarak çekirdeğe yer değiştirir.

Burada hücreleri stresin zararlı etkilerinden korumak için antioksidanla ilişkili gen ekspresyonunu düzenler (Song ve ark. 2021).

2.14. TAS/TOS (Total Antioksidan Seviye/Total Oksidan Seviye)

Reaktif oksijen metabolitleri (ROM) veya diğer bir ifadeyle serbest radikaller (SR), antioksidatif yanıtta bir eksiklik varlığında veya Reaktif oksijen türleri (ROS) seviyesi yükseldiğinde lipid peroksidasyonu, DNA hasarı ve enzim inaktivasyonu ile dokularda ve hücrelerde hasara sebep olabilmektedir (Bulut ve ark. 2013). ROS, metabolik ve fizyolojik süreçlerin sonucunda üretilir ve organizmada zararlı oksidatif reaksiyonlar ortaya çıkabilir. Böyle durumlarda, oksitleyicilerdeki artış ve antioksidanlardaki azalmanın önüne geçilemez ise oksidatif/antioksidatif denge oksidatif tarafa doğru kayar ve oksidatif stres ortaya çıkar. Oksidan moleküller, organizmalarda hem endojen olarak üretilebilir hem de dış ortamdan alınabilirler. Elektron taşıma zinciri ve ksantin oksidaz ile glikolat ve monoamin oksidazlar gibi bir dizi oksidaz enzimi, ROS kaynaklarını oluştururlar (Erel 2005).

2.15. Hesperidin

Flavonoidler bitkisel bileşik yapılarıdır ve superoksit, hidroksil, peroksil, alkoksi ve nitrik oksit radikallerini temizlemektedirler. Antiinflamatuvar etkinliklerini, lipooksijenaz, siklooksijenaz ve fosfolipaz-A enzimlerini inhibe ederek gösterirler. Bununla beraber glutatyon redüktaz, NADH-oksidad (nikotinamit adenin dinükleotit), ksantin oksidaz ve protein kinaz gibi bazı enzimleri inhibe ettikleri de bilinmektedir (Çimen 1999). Hesperidin, tarihte ilk olarak 1828 yılında Lebreton isimli Fransız bir kimyacı tarafından narenciye kabuğunda bulunan beyaz iç katmandan izole edilmiştir (Lebreton 1828). Hesperidin, antioksidan özelliği ile öne çıkan bir flavonoidtir (Kuntic ve ark. 2014). Limon ve tatlı portakalda bol miktarda hesperidin bulunmaktadır (Carballo-Villalobos ve ark. 2016). İçirildikten 2 saat sonra plazmada pik yapar (Çimen 1999). Farmakolojik olarak ise; güçlü antioksidan (Banji ve ark. 2014, Carballo-Villalobos ve ark. 2016, Yurtal ve ark. 2020), analjezik (Carballo-Villalobos ve ark. 2016), antiinflamatuvar, antimikrobiyal (Subramanian ve ark. 2015), antikarsinogenik, antihipertansif (Polat ve ark. 2016), immünmodülatör (Rezaeyan ve ark. 2016), antiallerjenik, nöroprotektif, hipolipidemik, vazodilatör, antihiperkolesterolemik (Subramanian ve ark. 2015), UV ve radyasyondan koruma (Kuntic ve ark. 2014), hepatoprotektif (Banji ve ark. 2014), östrojenik (Çimen 1999) ve sedatif özellikleri vardır (Carballo-Villalobos ve ark. 2016).

Mevcut çalışmada, ratlarda deneysel olarak oluşturulacak stafilokokla ilişkili osteomiyelitlerde yüksek antioksidatif ve antiinflamatuvar özelliklere sahip olan hesperidinin terapötik etkisinin araştırılması amaçlandı.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada 250-300 gram ağırlığında Wistar Albino ırkı erkek ratlar kullanıldı. Ratlar 22 ± 2 °C oda ısısında, 12 saat gece 12 saat gündüz koşullarında barındırıldı. Deneylere başlamadan önce 1 hafta süreyle hayvanların ortama uyumu sağlandı, yeme ve suya erişim serbestti. Daha sonra denekler rastgele 4 gruba ayrıldı (n=7). Gruplar, Grup 1: Kontrol grubu; Grup 2: Sham grubu; Grup 3: Osteomiyelit grubu (OM); Grup 4: Tedavi Grubu; Hesperidin (Hesperidin, Sigma-Aldrich, Amerika Birleşik Devletleri) (200 mg/kg, oral, 4 hafta, günde 1 kez) (Yurtal ve ark. 2020) + Osteomiyelit grubu (HSP+OM) şeklinde idi. Hayvanları aynı strese maruz bırakmak için grup 1,2 ve 3 teki ratlara, grup 4'teki ratlar ile aynı oranda (1 ml) serum fizyolojik iştirildi.

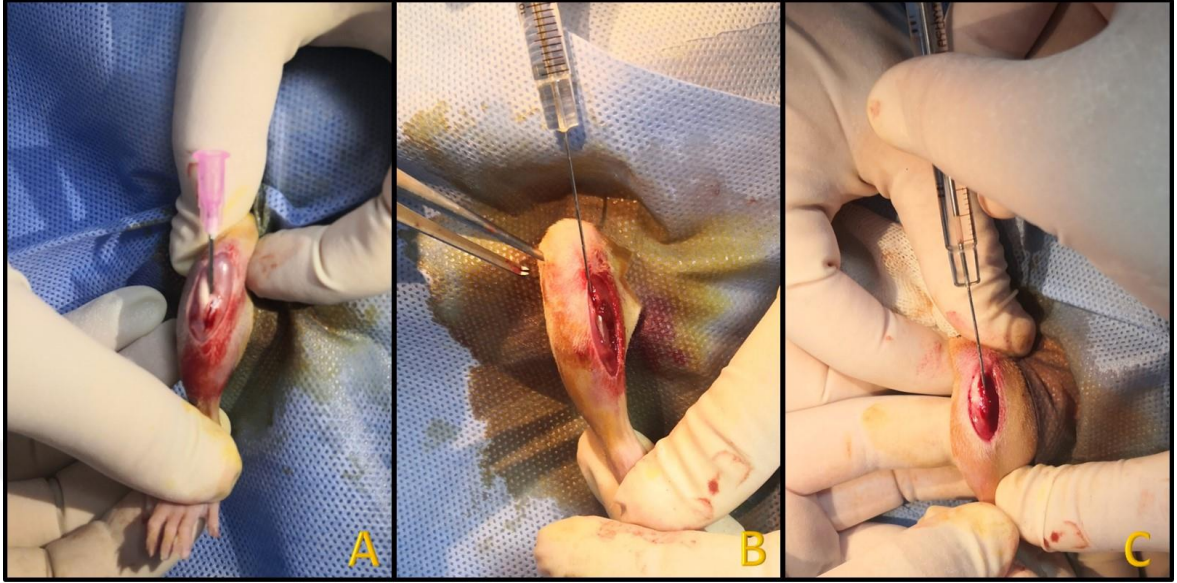
3.1. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması

Bir *S. aureus* kolonisi, besleyici agara inoküle edildi ve 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Daha sonra, 37° C'de 18 saat süreyle besi yerinde bir alt kültür yapıldı. Bu kültür daha sonra 1×10^6 koloni/5 mikrolitre elde etmek için seyreltilti.

3.2. Enfeksiyon Oluşturma Prosedürü

Deneklere intraperitoneal (ip) yolla ksilazin (Rompun %2®, Bayer, Türkiye) (5 mg/kg) ve ketamin (Keta-Control®, Doğa İlaç, Türkiye) (50 mg/kg) kombinasyonu uygulanıp anestezi sağlandıktan sonra sağ arka bacaklar tıraş edildi ve enjeksiyon bölgesi batikon ile temizlendi. Daha sonra 18 gauge iğne ile tibia'nın metafizinin lateral kısmından medüller boşluğa perkütan olarak girildi (Grup 2, 3 ve 4). Grup 2 de medüller kanala 5 mikrolitre serum fizyolojik enjekte edildi. Enfeksiyon oranını yükseltmek için sklerozan ajan olarak araşidonik asit (Cayman Chemical Company, Amerika Birleşik Devletleri) kullanıldı (Rissing ve ark. 1985). Medullar kanala öncelikle 5 mikrolitre araşidonik asit, ardından 5 mikrolitre (1×10^6) bakteriyel süspansiyon (*Staphylococcus aureus*) ve son olarak 5 mikrolitre steril serum fizyolojik Hamilton (Hamilton, Amerika Birleşik Devletleri) enjektörü ile enjekte edildi (Grup 3 ve 4) (Şekil 3.1). Bu sayede kemik iliğine sklerozan ajanın ve bakterilerin tamamının girmesi sağlanmış oldu (Norden ve Kennedy 1970). İğne daha sonra çıkarıldı ve iğne deliği kemik mumu (Bonewax-Cliniwax, Yücel Medikal Ltd.Şti,

Türkiye) ile kapatıldı. Osteomiyelit; radyografik, biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler ile değerlendirildi.



Şekil 3.1. Enfeksiyon oluşturma presedürü a. 18 gauge iğne ucu ile medullar kanala girilmesi b-c. Hamilton enjektörü ile medullar kanala inokulasyon uygulanması.

3.3. Radyografik Değerlendirme

Çalışma toplamda 4 hafta sürdü. 4. haftanın sonunda ratlar derin anestezi altında intrakardiyak kanları alınarak sakrifiye edildi. Sakrifikasyondan hemen sonra ratların sağ tibialarının AP pozisyonunda 45 kilovolt (kV) ile 1.3 miliamper saniye (mAs) değerlerinde radyografileri (Browiner Beatle-05v, Shanzhen Brownier Technology, Çin) alındı.

Radyografik değerlendirme inokülasyon yapıldıktan sonraki 4.haftada değerlendirildi. Her tibia için periostal elevasyon, yapısal deformasyon, kemik şaftının genişlemesi, yumuşak doku deformasyonu ve yeni kemik oluşumu varlığı belirlendi. Osteomiyelitin radyografik bulguları 0-4 arasında kör olarak (0-Bulgu yok, 1-Hafif, 2-Orta, 3-Şiddetli, 4-Çok şiddetli) skorlandı (Çizelge 3.1). Her grupta tek bir bileşik skor elde etmek için her parametrenin puanlarının ortalaması alındı (Gillaspy ve ark. 1995).

Çizelge 3.1. Radyografik değerlendirme

Skorlama Kriterleri ve Skorlar	0-Yok	1-Hafif	2-Orta	3-Şiddetli	4-Çok şiddetli
Periostal Elevasyon					
Yapısal Deformasyon					
Kemik Şaftının Genişlemesi					
Yumuşak Doku Deformasyonu					
Yeni Kemik Oluşumu					

3.4. Histopatolojik Değerlendirme

Deney hayvanlarından elde edilen kemikler % 10'luk tamponlu formalin solüsyonu içerisinde 24 saat fikse edildikten sonra dekalsifiye işlemi için 4N formik asit (% 10) solüsyonu içine alındı. Dekalsifiye olana kadar günlük kontrol edildi ve ardından akan suda yıkanarak, uygun kesitler (proksimal tibiadan bir transvers kesit ve geri kalan tibiadan longitudinal bir kesit) alınıp rutin takip işlemleri yapıldı. Rutin takip sonrası parafine gömülen doku örneklerinden 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak hematoksilen-eozin boyama tekniği ile boyandı. Boyanan kesitler kör olarak binoküler ışık mikroskobu ile incelendi ve önceden belirlenen kriterlere göre osteomiyelit semikantitatif olarak skorlandı (Çizelge 3.2) (Smeltzer ve ark. 1997).

Çizelge 3.2. Histolojik parametreler ve skorlama sistemi (Smeltzer ve ark. 1997)

Skor	Patoloji
	İntraosseöz akut inflamasyon
0	Mevcut değil
1	İntramedüller apse olmaksızın minimum ila hafif inflamasyon
2	İntramedüller apse olmaksızın orta ila şiddetli inflamasyon
3	İntramedüller apse ile minimum ila hafif inflamasyon
4	İntramedüller apse ile orta ila şiddetli inflamasyon
	İntraosseöz kronik inflamasyon

0	Mevcut değil
1	Önemli intramedüller fibroz olmaksızın minimal ila hafif kronik inflamasyon
2	Belirgin intramedüller fibroz olmaksızın orta ila şiddetli kronik inflamasyon
3	Önemli intramedüller fibroz ile minimum ila hafif kronik inflamasyon
4	Önemli intramedüller fibroz ile orta ila şiddetli kronik inflamasyon
	Periosteal inflamasyon
0	Mevcut değil
1	Subperiostal apse oluşumu olmadan minimum ila hafif inflamasyon
2	Subperiostal apse oluşumu olmaksızın orta ila şiddetli inflamasyon
3	Subperiostal apse oluşumu ile minimum ila hafif inflamasyon
4	Subperiostal apse oluşumu ile orta ila şiddetli inflamasyon
	Kemik nekrozu
0	Nekroz bulgusu yok
1	Sekestrumun tek odak noktası
2	Multiple sekestra odakları
3	Sekestrum olmaksızın tek nekroz odağı
4	Sekestrasız çoklu nekroz odakları

3.5. Biyokimyasal Değerlendirme

3.5.1. Dokulardan Lizat ve Protein Örneklerinin Hazırlanması

Deneme sürelerinden sonra cerrahi yöntemle alınan doku örnekleri, buz olan küvete konuldu ve santrifüjden sonra tüplerdeki süpernatantlar atıldıktan sonra pelet üç kez buz soğukluğunda PBS (1,3 M NaCl, 0.027 M KCl, 0.1 M Na₂HPO₄ ve 0.018 M KH₂PO₄, pH7.4) ile yıkandı. Daha sonra içerisinde 1/200 oranında proteaz inhibitör kokteyli (AEBSF, Aprotinin, Bestatin, E-64, Leupeptin, Pepstain A) eklenen lizis buffer (20 mM Tris HCl, pH7,5) herbir kuyucuğa 500 µl hacimde verilerek doku protein örnekleri elde edildi. Hazırlanan örneklerden TAS (Rel Assay Diagnostics, Türkiye) ve TOS (Rel Assay Diagnostics, Türkiye) analizleri spektrofotometrik, NF-κB ve Nrf-2 transkripsiyon düzeyleri ise ELİSA metoduyla araştırıldı.

3.5.2. Protein Düzeylerinin Araştırılması

Elde edilen homojenat örneklerinden, NF-κB (FineTest, Çin) ve Nrf-2 (FineTest, Çin) protein transkripsiyon düzeyi hazır olarak üretilmiş ticari kitin temini ile ELİSA yöntemiyle araştırıldı.

3.5.3. Oksidatif Stres İndeksinin Araştırılması

Bu amaçla elde edilen lizat örnekleri kullanılarak oksidatif stres indeksi (OSİ=TOS/TAS), spektrofotometrik olarak araştırıldı.

3.6. İstatistiksel Analizler

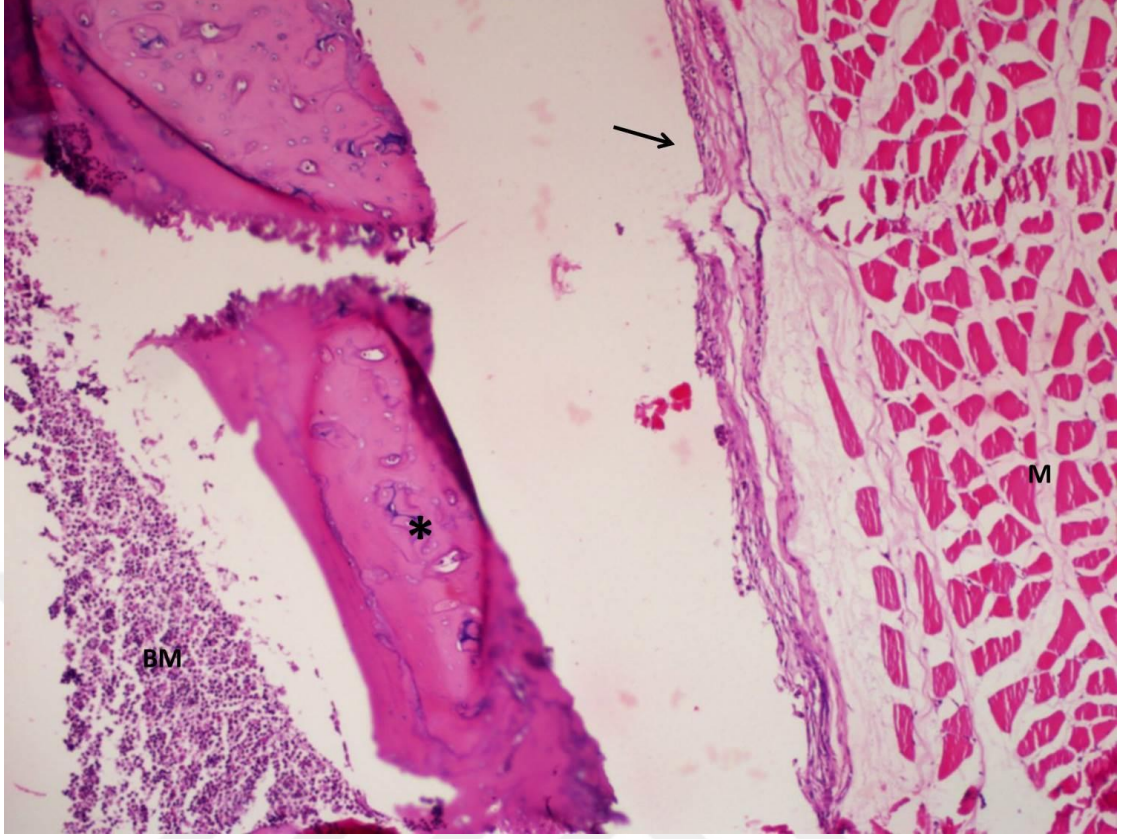
Önemlilik testlerine geçilmeden önce değişkenlere parametrik test varsayımlarından normallik için Shapiro Wilk testi, varyansların homojenliği için Levene testi uygulandı. Histopatolojik skorlar “Medyan (minimum-maksimum)” olarak, radyografik skorlar ise “Ortalama, standart hata, medyan, minimum ve maksimum” olarak ifade edildi. Ayrıca, biyokimyasal değişkenler “Ortalama $\pm$ standart hata” şeklinde grafiksel olarak gösterildi. Shapiro-Wilk testi ile histopatolojik ve radyografi skorlarının normal dağılmadığı saptandığı için nonparametrik testler kullanıldı. Gruplar arasındaki histopatolojik ve radyografi skorları farklılıkları Kruskal-Wallis testi ve ardından çoklu karşılaştırmalar için Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney U testi kullanıldı. Çalışmadaki biyokimyasal değişkenlerin gruplar arasındaki farklılıkları tek yönlü varyans analiz yöntemiyle ortaya konuldu. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan değişkenler için ileri aşama (post hoc) testi olarak Duncan testi kullanıldı. $p < 0.05$ ve bunun altındaki sonuçlar önemli olarak değerlendirildi. Tüm istatistiksel analizler IBM SPSS 22.0 istatistik programı kullanılarak gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

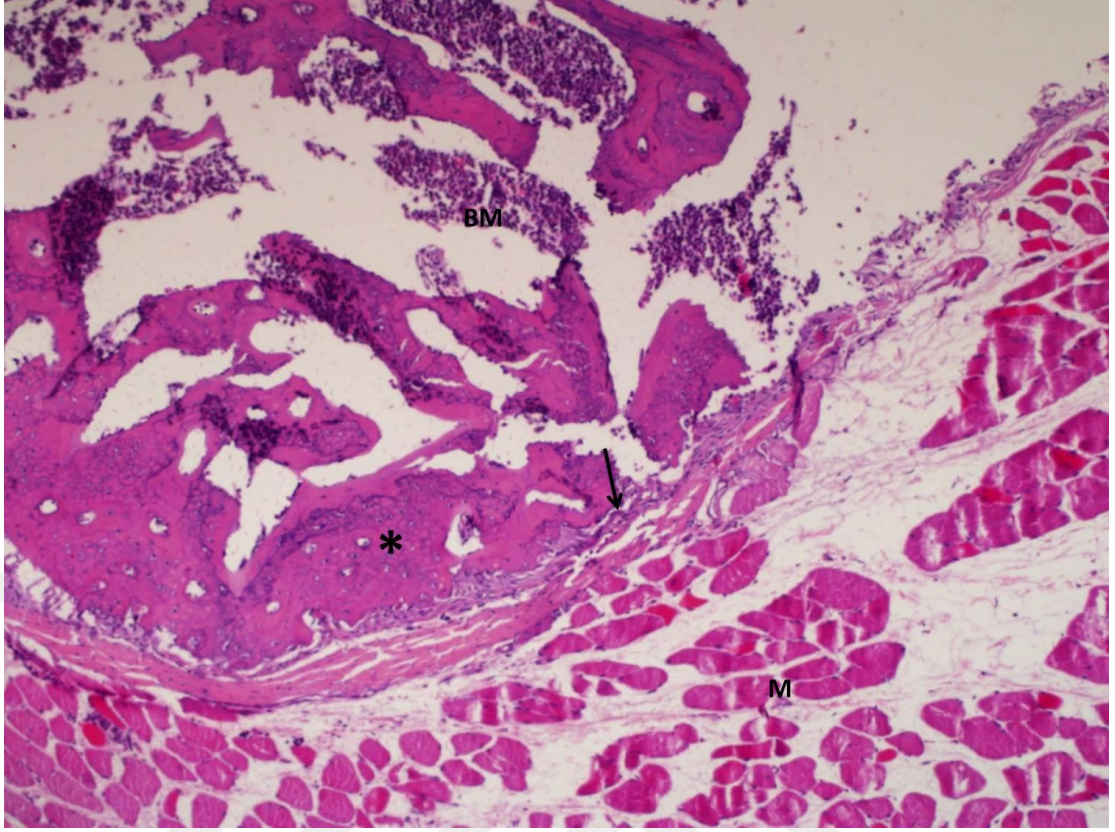
4.1. Histopatolojik Bulgular

Mevcut çalışmada, histopatolojik olarak intraosseöz akut inflamasyon, intraosseöz kronik inflamasyon, periosteal inflamasyon ve kemik nekrozu değerlendirildi.

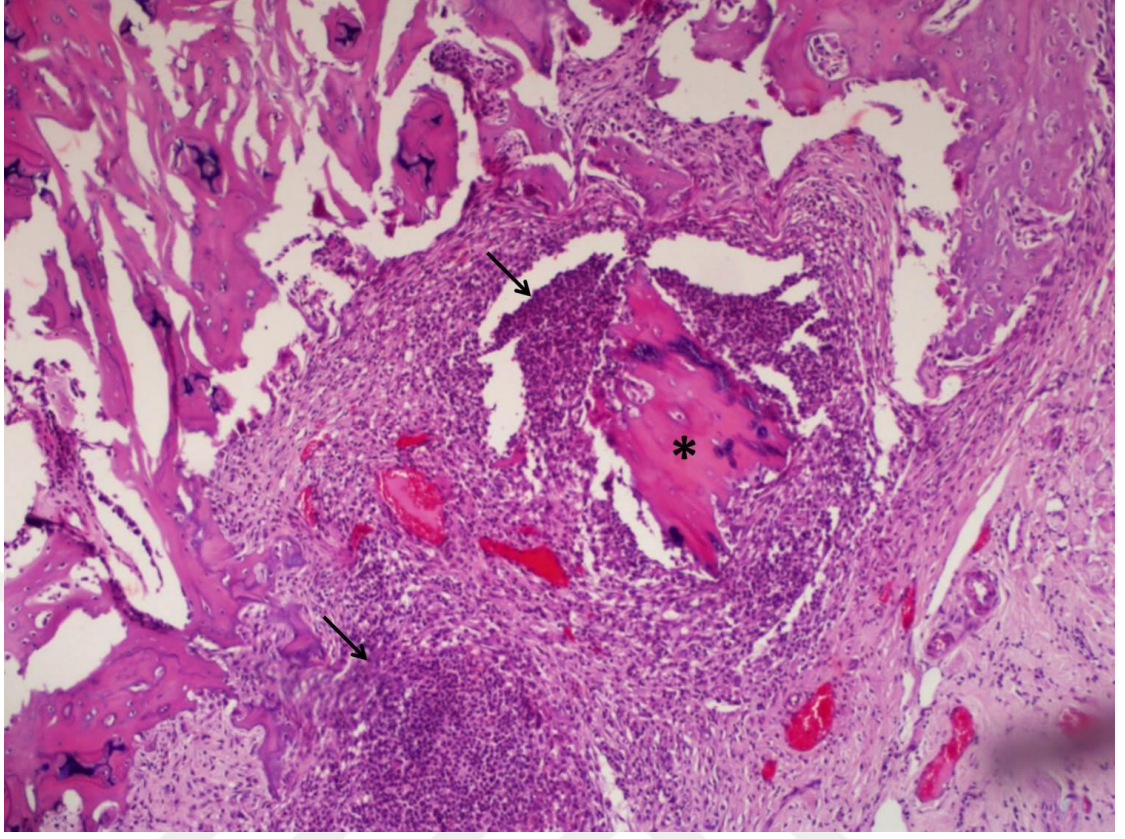
Kontrol grubunda intraosseöz akut inflamasyon, intraosseöz kronik inflamasyon, periosteal inflamasyon veya kemik nekrozu—izlenmedi (Şekil 4.1). Sham grubunda intraosseöz akut inflamasyon (İAİ) ve kemik nekrozu (KN) hiç görülmedi, intraosseöz kronik inflamasyon (İKİ) ve periosteal inflamasyon (PI) en fazla skor 1 düzeyindeydi. Bu bulgular bize Sham grubunda oluşan inflamasyonun ihmal edilebilir düzeyde hafif olduğunu ve osteomyelit oluşmadığını göstermektedir (Şekil 4.2). OM grubunda İAİ skor 3-4, İKİ skor 2-3, PI skor 3-4, KN skor 1-3 düzeyindeydi, sonuç olarak toplam skor 9-14 arasında değişmekteydi (Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5). Tedavi grubunda İAİ skor 1-2, İKİ skor 0-2, PI skor 0-2, KN skor 0-1 düzeyindeydi, sonuç olarak toplam skor 2-6 arasında değişmekteydi (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7).



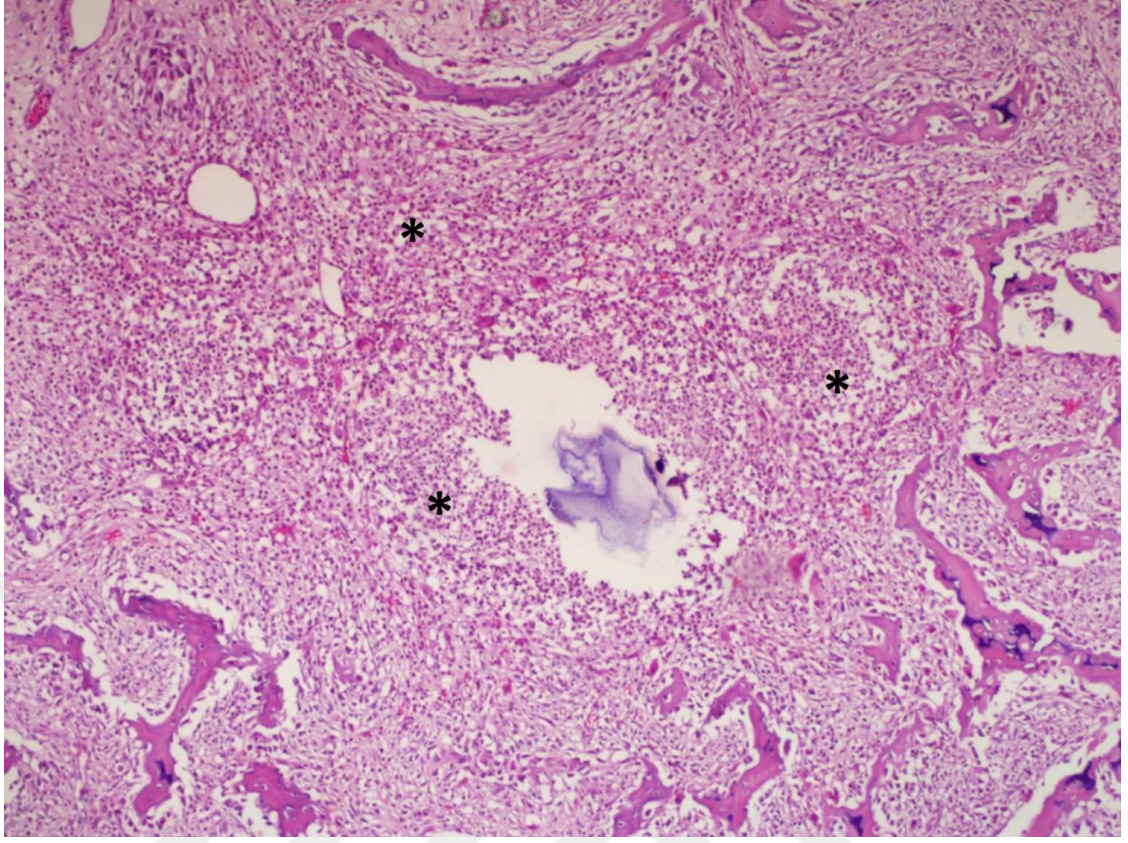
Şekil 4.1. Kontrol grubuna ait kesitte olağan morfolojide kas dokusu (M), periost (ok işareti), kemik dokusu (yıldız işareti), kemik iliği mesafesi (BM) izlenmektedir. İnflamasyon veya nekroz bulunmamaktadır. H&Ex100.



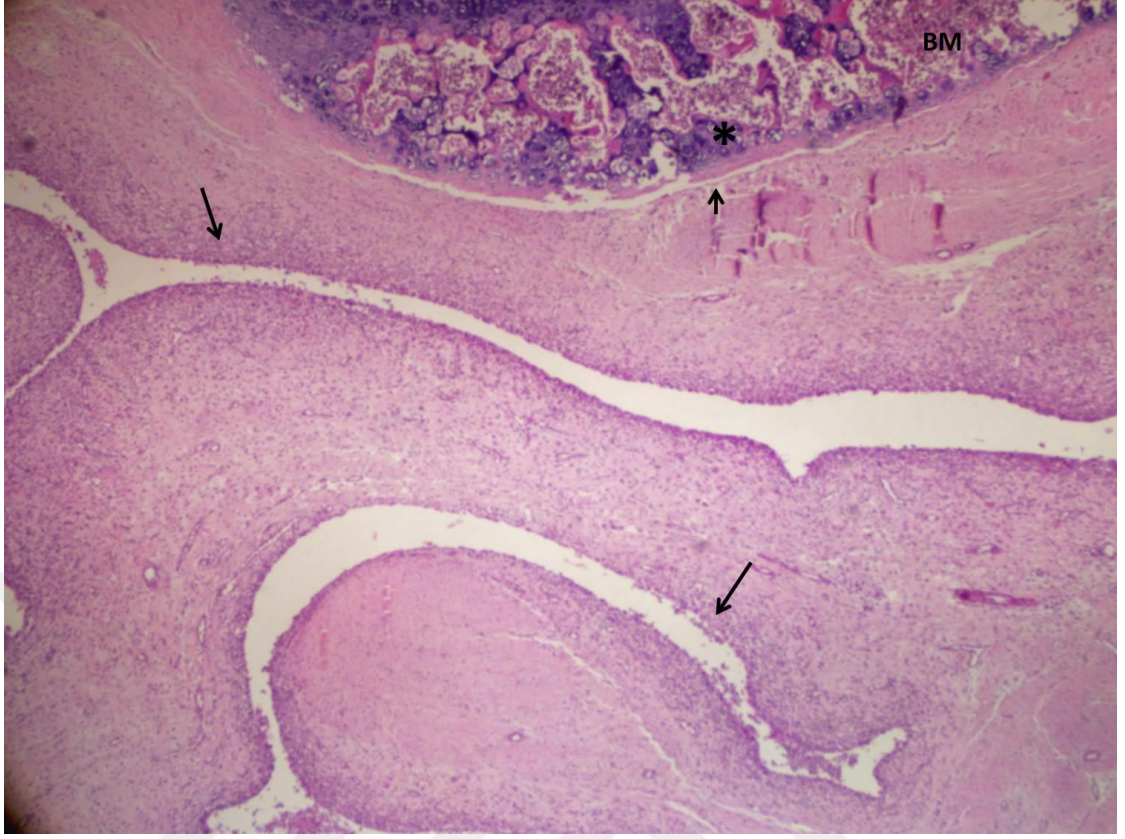
Şekil 4.2. Sham grubuna ait kesitte olağan morfolojide kas dokusu (M), periost (ok işareti), kemik dokusu (yıldız işareti), kemik iliği mesafesi (BM) izlenmektedir. İnflamasyon veya nekroz bulunmamaktadır. H&Ex100.



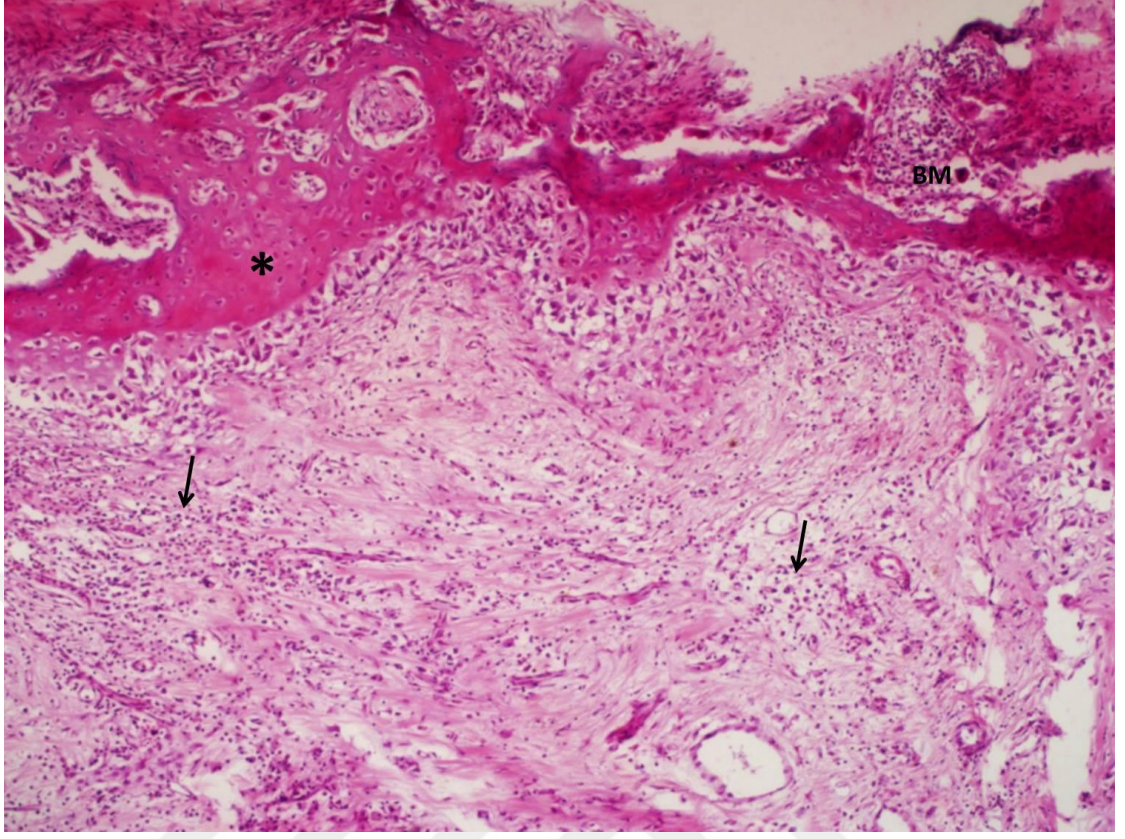
Şekil 4.3. Osteomiyelit grubuna ait kesitte kortikal apse oluşumları (ok işaretleri) ve sekestre kemik (yıldız işareti) görünmektedir. H&Ex100.



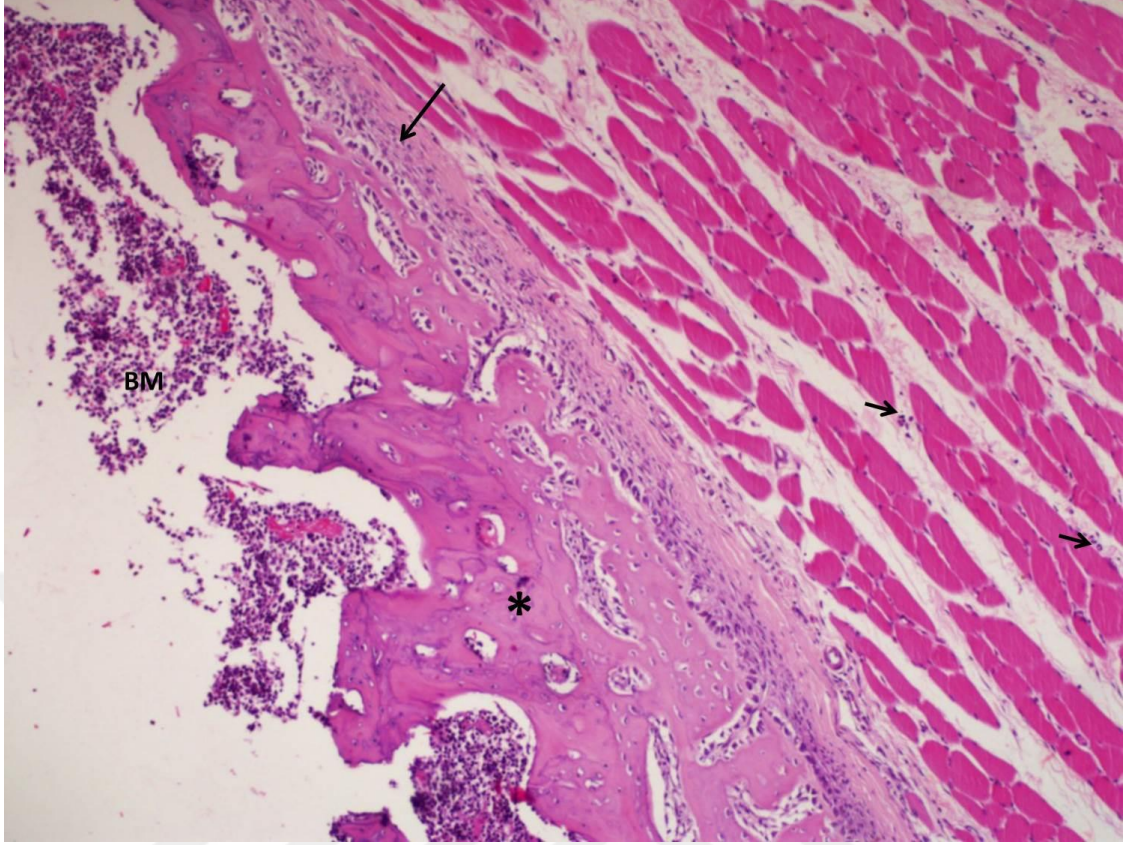
Şekil 4.4. Osteomiyelit grubuna ait kesitte intramedüller alanda yaygın aktif kronik inflamasyon ve apse oluşumları (yıldız işaretleri) izlenmektedir. H&Ex100.



Şekil 4.5. Osteomiyelit grubuna ait kesitte ekstraperiosteal yumuşak dokuda yoğun aktif kronik inflmasyon ve fistül oluşumu (uzun ok işaretleri) görülmektedir. (Kısa ok: periost, yıldız: kemik, BM: kemik iliği mesafesi). H&Ex40.



Şekil 4.6. Tedavi grubuna ait kesitlerde apse formasyonu olmaksızın orta/şiddetli düzeyde aktif kronik inflamasyon (ok işaretleri) izlenmektedir. Aps formasyonu veya kemik nekrozu görülmemektedir. (Yıldız: kemik dokusu), BM: kemik iliği mesafesi). H&Ex100.



Şekil 4.7. Tedavi grubuna ait başka bir deneğe ait kesitlerde ise dokular olağan morfolojiye çok yakın görünmekte olup sadece hafif düzeyde subperiosteal inflamasyon (uzun ok işareti) ve çevre kas dokusunda hafif düzeyde inflamasyon (kısa ok işareti) izlenmektedir. Apse formasyonu veya kemik nekrozu görülmemektedir. (Yıldız: kemik, BM: kemik iliği mesafesi). H&Ex100.

Çizelge 4.1. Histopatolojik bulguların istatistiksel verileri (Medyan (minimum-maksimum))

Grup	İAİ	İKİ	Pİ	KN	Toplam skor
Kontrol	0 (0-0) ^c	0 (0-0) ^c	0 (0-0) ^c	0 (0-0) ^b	0 (0-0) ^d
Sham	0 (0-0) ^c	0 (0-1) ^c	0,5 (0-1) ^c	0 (0-0) ^b	1 (0-2) ^c
OM	3 (3-4) ^a	3 (2-3) ^a	3 (3-4) ^a	2 (0-3) ^a	11 (9-14) ^a
Tedavi	2 (1-2) ^b	2 (1-2) ^b	2 (0-2) ^b	0 (0-1) ^b	6 (2-6) ^b

*a,b,c: Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlılığı ifade eder (p<0,05).

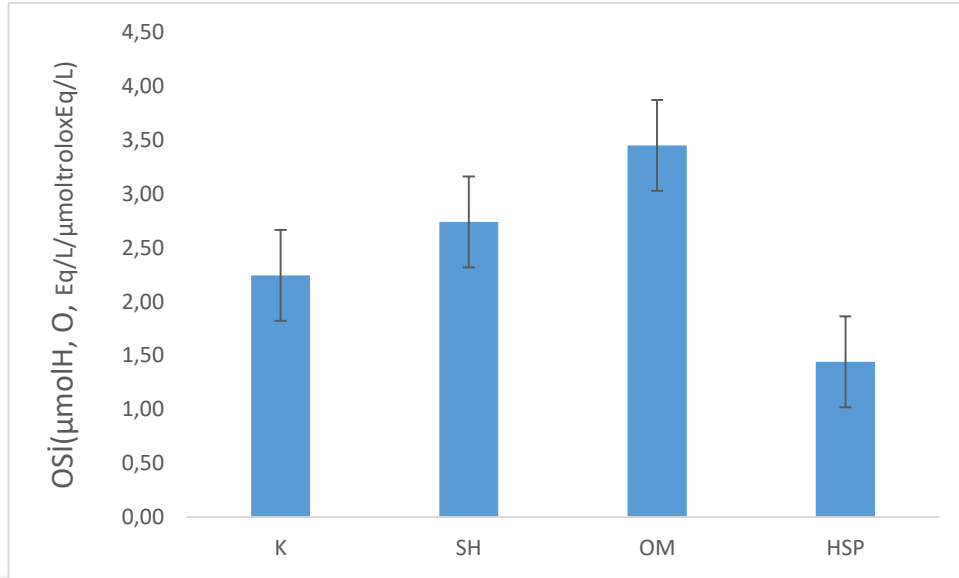
Gruplar arasında İAİ, İKİ, Pİ, KN ve toplam histopatolojik skor anlamlı farklılık göstermekteydi (tüm parametreler için p<0.001, Kruskal Wallis test). Histopatolojik değerlendirmede kontrol grubunda İAİ, İKİ, Pİ, KN görülmedi. Sham grubunda ise İAİ ve KN hiç görülmedi, İKİ ve Pİ ise sadece hafif düzeydeydi. OM grubunda ise tüm deneklerde

intramedüller apse oluşumu ile minimumdan şiddetliye kadar değişen akut inflamasyon, hafiften şiddetliye değişen oranlarda kronik inflamasyon, değişen oranlarda periosteal inflamasyon ve kemik nekrozu izlendi. OM grubunda sadece bir denekte kemik nekrozu görülmüdü. OM grubunun toplam histopatolojik skor ortancası, Kontrol ve Sham gruplarının toplam skor ortancaları ile anlamlı fark (her iki p değeri <0.001) göstermekteydi. Bu bulgular bize osteomiyelit modelinin oluşturulduğunu kanıtladı. Tedavi grubunda İAİ ve İKİ tüm deneklerde devam etmekle birlikte şiddeti OM grubuna göre daha hafif düzeydeydi. Tedavi grubunda 1 denekte hafif diğerlerinde orta ila şiddetli İAİ inflamasyon; 3 denekte minimal ila hafif İKİ, 5 denekte ise orta ila şiddetli İKİ izlendi , ancak intramedüller apse formasyonu veya belirgin fibrozis hiçbirinde görülmüdü; kemik nekrozu ise sadece 2 denekte mevcuttu. Tedavi grubunun İAİ, İKİ, Pİ, KN ve toplam histopatolojik skoru ortanca değerleri OM grubunun histopatolojik skorlarının ortanca değerlerine kıyasla anlamlı derecede düşüktü (sırasıyla $p<0.001$, $p=0.005$, $p=0.001$, $p=0.006$ ve $p=0.001$; Mann-WhitneyU test) (Çizelge 4.1). Bu bulgular bize hesperidinin inflamasyonu baskılayarak osteomiyelitin tedavisine katkıda bulunabileceğini göstermektedir.

4.2. Biyokimyasal Bulgular

4.2.1. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ=TOS/TAS)

Elde edilen verilere göre sham grubunda ve OM grubunda kontrol grubuna göre sırasıyla % 22 ve % 54 oranlarında artış görülmüştür. Osteomiyelit oluşturulduktan sonra hesperidin uygulanan grupta bu değerin yalnızca osteomiyelit grubuna göre % 58 oranında iyileştirildiği bulunmuştur.



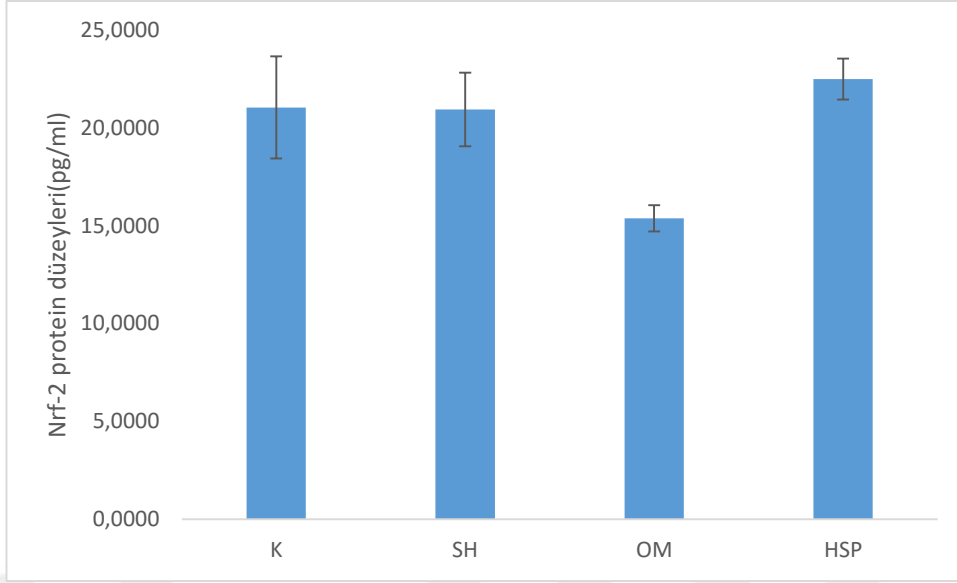
Şekil 4.8. Denemeler sonrası OSİ değerleri.

Bu veriler değerlendirildiğinde oluşturulan osteomiyelit deneme modelinde oksidatif stresin anlamlı düzeyde arttığı bununla birlikte tedavi amacıyla kullanılan hesperidinin oksidatif stresi anlamlı düzeyde azaltarak güçlü antioksidan etki gösterdiği ortaya konulmuştur (Şekil 4.8).

4.2.2. Nrf-2

Elde edilen verilere göre Nrf-2 transkripsiyon düzeyleri sham (20.94 ± 4.20 - $p > 0.05$) grubunda kontrol grubuna göre % 0,2 oranında artarken, OM grubunda (15.38 ± 1.4 - $p < 0.05$) % 26 oranında azaldığı görülmüştür. Bununla birlikte bu değerin tedavi grubunda (22.5 ± 2.4 , $p < 0.05$) bu değerin osteomiyelit grubuna göre % 42 oranında arttırdığı bulunmuştur (Şekil 4.9).

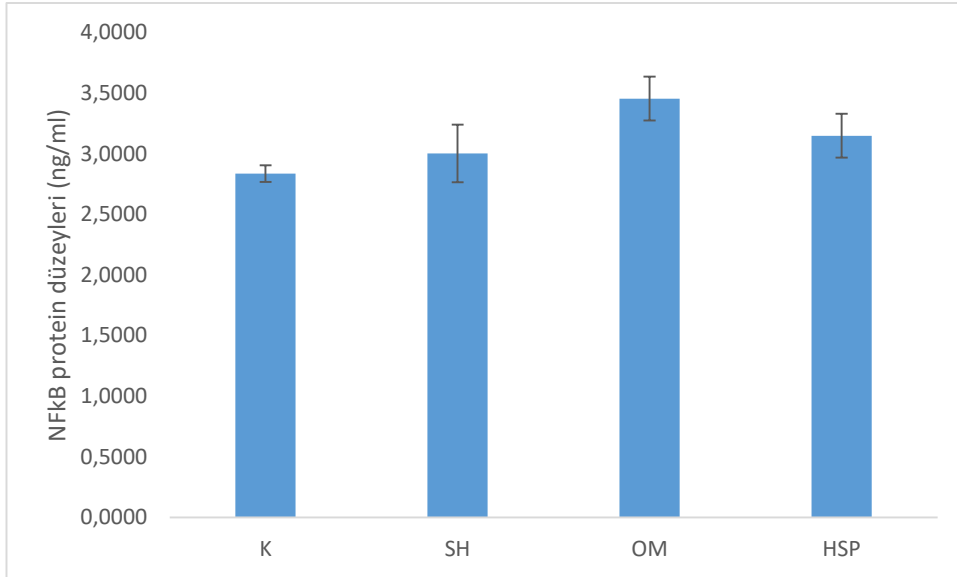
Bu değerler ışığında osteomiyelit modelinde antioksidan sistemin transkriptör faktörü olan azalan Nrf-2 düzeylerinin hesperidin tedavisiyle anlamlı derecede uyarıldığı ortaya konulmuştur.



Şekil 4.9. Nrf-2 translasyon düzeyleri

4.2.3. NF-κB

Elde edilen verilere göre NF-κB translasyon düzeyleri sham (3.00 ± 0.53) ve OM (3.45 ± 0.4) gruplarında kontrol (2.83 ± 0.15) grubuna göre sırasıyla % 6 ($p > 0.05$) ve % 21 ($p < 0.05$) oranında arttığı görülmüştür. Bununla birlikte bu değerlerin tedavi grubunda (3.14 ± 0.4) osteomyelit grubuna göre % 9 ($p < 0.05$) oranında azaldığı bulunmuştur (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. NF-κB protein düzeyleri.

Elde edilen verilerin değerlendirildiğinde osteomyelit oluşturulan ratlarda yangı başlatıcı sitokinlerin üretilmesinde sorumlu transkriptör faktör NF-κB'nin translasyon seviyelerinin

anlamalı derecede arttığı bununla birlikte osteomiyelit oluşturulan ratlara tedavi amacıyla uygulana hesperidinin ise bu proteinin translayon seviyelerini anlamalı derecede azalttığı kanıtlanmıştır.

Araştırmada elde edilen bulgular sonucunda deneysel oluşturulan osteomiyelit modelinde hesperidinin gerek güçlü antioksidan gerekse de etkin antiinflamatuvar etkinlik göstererek tedavide anlamalı bir alternatif olabileceği kanısına varıldı.

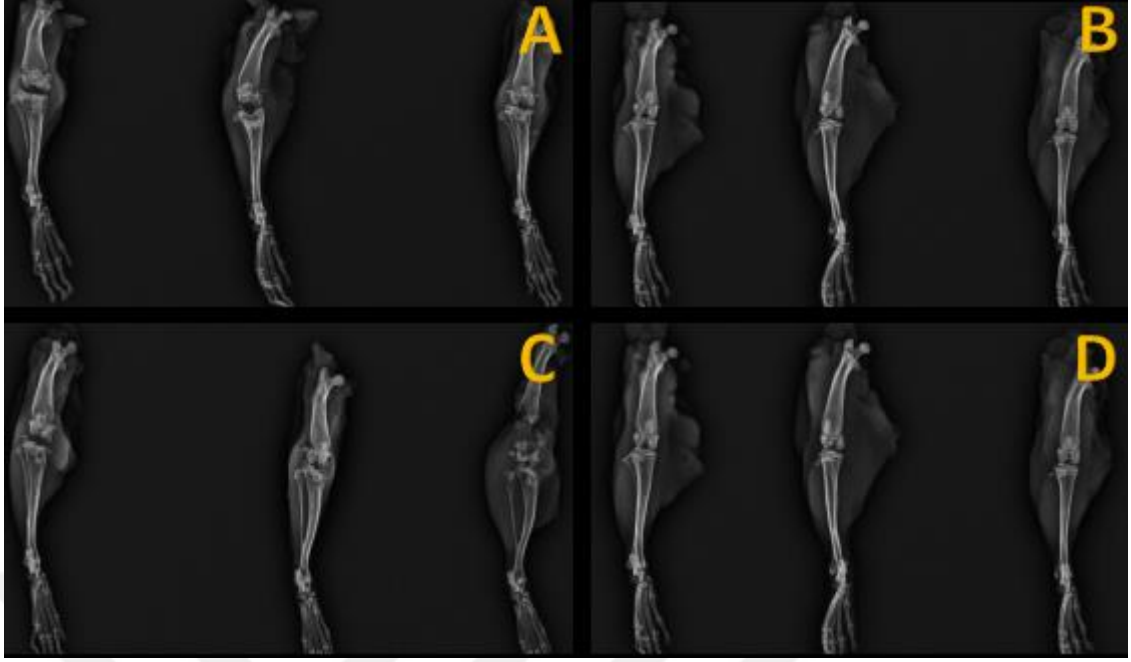
4.3. Radyografik Bulgular

Radyografik olarak periostal elevasyon, yapısal deformasyon, kemik şaftının genişlemesi, yumuşak doku deformasyonu ve yeni kemik oluşumu değerlendirildi (Şekil 4.11). Osteomiyelitin radyografik bulguları 0-4 arasında kör olarak (0-Bulgu yok, 1-Hafif, 2-Orta, 3-Şiddetli, 4-Çok şiddetli) skorlandı ve istatistiki verileri Çizelge 4.2’de sunuldu. Bu bulgulardan yola çıkarak, sham grubunda sadece serum fizyolojik uygulaması yapıldığı için istatistiki olarak kontrol grubu ile benzer sonuçlar çıktı. OM grubu, sham ve kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiki olarak anlamalı düzeyde bileşik skorda bir artış oldu ($p<0.05$). OM grubu ile tedavi grubu karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamalı olmamakla birlikte hesperidin, klinik açıdan önemli olabilecek seviyede bir iyileşme sağlamıştır.

Çizelge 4.2. Deney gruplarında yer alan ratların radyografik skorlaması

Değişken	Grup	Arit. Ort.	Std. Hata	Medyan	Minimum	Maksimum	p	Harf *
Toplam Skor	Kontrol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,001	c
	Sham	2,29	0,42	3,00	0,00	3,00		bc
	OM	9,57	0,78	9,00	7,00	12,00		a
	Tedavi	6,29	0,78	7,00	3,00	8,00		ab

*a,b,c: Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlılığı ifade eder ($p<0,05$).



Şekil 4.11. Radyografik bulgular A: Kontrol grubuna ait radyografik görüntülerde herhangi bir patolojik görüntüye rastlanmadı. B: Sham grubuna ait radyografik görüntülerde proksimal tibiada hafif inflamatuvar değişiklikler göze çarpmaktadır. C: OM grubunda proksimal tibiada ciddi kemik deformasyonları ve sekestrumlar görünmektedir. D: Tedavi grubunda radyografik bulguların OM grubuna göre daha ılımlı olduğu ve kemik deformasyonlarının daha az olduğu dikkat çekmektedir.

5. TARTIŞMA

Kas-iskelet sistemi enfeksiyonlarından olan osteomiyelit tedavisi, hem hekime hem de sağlık sistemine önemli bir yük oluşturmaktadır (Birt ve ark. 2017). Osteomiyelit tedavisinde, drenaj, kapsamlı debridman, ölü boşluğun obliterasyonu, yaranın bakımı, kemiğin stabilizasyonu (gerekirse) ve kültüre yönelik antibiyotik kullanımı gerekir (Carek ve ark. 2001, Calhoun ve ark. 2009). Bununla beraber osteomiyelit, enfeksiyon bölgesine antibiyotik penetrasyonunun düşük olması nedeniyle de kalıcı ve geleneksel antibiyotik tedavisine dirençli olduğu bilinen bir hastalıktır (Kadry ve ark. 2004). Bu çalışmanın amacı, kronik stafilokokal osteomiyelitin rat modelinde yüksek antioksidan, antiinflamatuvar ve antimikrobiyal özelliği ispatlanmış olan hesperidin kullanılarak yeni bir destek tedavi rejimi geliştirmektir.

Hematojen osteomiyelitlerde hemen hemen her zaman kemikten tek bir patojen izole edilir. Yetişkinlerde, en yaygın izole edilen organizma *Staphylococcus aureus*'tur (Carek ve ark. 2001, Lew ve Waldvogel 2009, Calhoun ve ark. 2009) ve hastalığın görülme insidansı erkeklerde dişilerden daha yüksektir (Roesgen ve ark. 1989, Massaccesi ve ark. 2022). Bu nedenle mevcut çalışmada erkek ratlarda osteomiyelit modeli oluşturmak için *S. aureus* kullanıldı.

Rat tibial osteomiyelit modeli, Rissing ve ark. (1985) tarafından iyi bir şekilde tarif edilmiştir. Progresif osteomiyelit modeli oluşturmak ve bakteri tutulumunu artırmak amacıyla Sodyum morhuat veya Araşidonik asit gibi sklerozan ajanlar kullanılmıştır (Rissing ve ark. 1985, Mendel ve ark. 2005). Bu model ilerleyici bir osteomiyelit oluşturmakta ve histopatolojik olarak insan kronik osteomiyelitini andırmaktadır. Geliştirildiğinden beri de yaygın olarak kullanılmaktadır (Rissing ve ark. 1985, Gratz ve ark. 2001, Mendel ve ark. 2004, An ve ark. 2006). Mevcut çalışmada da sklerozan ajan olarak Araşidonik asit kullanıldı.

Kostić ve ark. (2020) yapmış oldukları bir in vitro *S. aureus* çalışmasında, kafeik asit, klorojenik asit, ferulik asit, morin, quersetin, isoquersitrin, rutin ve hesperidin gibi fenolik bileşikler denemişlerdir. Klinik izolatlarda fenolik bileşiklerin hepsi % 60'ın üzerinde bakteri tutulumunu inhibe etmişlerdir. Çalışmada kullanılan antibiyotikler de dahil olmak

üzere içlerinden sadece hesperidin, standart suş olarak tanımlanan, *S.aures* ATCC 11632 suşunun tutulumunu % 60'ın üzerinde inhibe ederek güçlü bir antimikrobiyal etki göstermiştir (Kostić ve ark. 2020). Mevcut çalışmada hesperidinin in vivo olarak canlı hayvan üzerindeki antimikrobiyal etkinliği araştırıldı.

Araştırmada hesperidinin osteomyelit grubuna göre antiinflamatuvar özeliğini NF-κB protein düzeylerini azaltarak ve antioksidan etkilerini ise Nrf-2 protein düzeylerini arttırarak göstermiştir. Bir nükleer transkripsiyon faktörü olan NF-κB'nin inflamatuvar, bağışıklık ve stres tepkilerinde yer alır. NF-κB hem doğuştan gelen hem de adaptif immüniteye proinflamatuvar sitokinlerin üretimi düzenleyerek katkıda bulunur (Li ve Verma 2002). Hücrelerde NF-κB'nin aktivasyonu, IL-1, IL-6, interlökin 8 (IL-8) ve TNF gibi proinflamatuvar medyatörlerin üretiminde artış ile sonuçlanır. Birkaç hayvan modelinde NF-κB aktivitesinin sürekli olarak inhibisyonunun, inflamatuvar hastalıkların kontrolünde etkili olduğu kanıtlanmıştır. Örneğin, romatoid sinovyumda NF-κB aktivitesi blokajının hem inflamasyonu hem de doku hasarı önlediği gösterilmiştir (Bondeson ve ark. 1999).

Fare modelleri kullanılarak NF-κB sinyal iletimi ile hesperidinin etkilerine ilişkin raporlar bulunmaktadır. Xiao ve ark., (2018) hesperidinin antin inflamatuvar etkinliğinin altında yatan sebebin NF-κB yolağını bloke ederek gösterdiğini rapor etmişlerdir. Diyabetik fare modelinde, hesperidin NF-κB seviyesini azalttığı gösterilmiştir (Iskender ve ark. 2017). Pinho Ribeiro ve ark. (2015), ağrı fare modelinde ise hesperidin NF-κB'nin aktivitesini baskıladığı ve antiinflamatuvar etkinlik gösterdiğini rapor etmişlerdir (Pinho Ribeiro ve ark., 2015). Guazelli ve ark. (2021), deneysel ülseratif kolitte hesperidin metil kalkonun TNF-alfa, IL-1B, NF-κB aktivasyonunu inhibe ederek antiinflamatuvar etkinlik gösterdiğini rapor etmişlerdir.

En yaygın flavonoidlerden biri olan polifenoller bitkilerde yaygın olarak bulunur. Hesperidin bir flavanon glikozittir ve turunçgillerde bol miktarda bulunur. HSP antioksidan, anti-inflamatuvar, anti-kanserojen, antialerjik ve nörofarmakolojik özellikler gibi birçok yararlı tıbbi etkilere sahiptir (Li ve Schluesener 2017). Birçok rodent modelinde sitokin salınımını ve oksidatif stresi baskılayarak ve NF-κB aktivasyonunun azaltarak antiinflamatuvar etkinlik gösterdiği rapor edilmiştir (Pinho-Ribeiro ve ark. 2015). Son yıllarda yapılan çalışmalar, hesperidin ve hesperetin peroksinitrit ve hidrojen peroksit gibi çeşitli oksidanların meydana getirdiği oksidatif strese ve hasara neden olan diğer bazı

kimyasallar ile toksinlere karşı etkilerinden dolayı, dokuları koruyucu etkinlikleri ön plana çıkmaktadır (Kalpana ve ark. 2009, Kamaraj ve ark. 2010, Shrivastava ve ark. 2013, Kawaguchi ve ark. 2004, Kim ve ark. 2004). Kalpana ve ark. (2009) Kırmızı kan hücrelerinde H₂O₂ kaynaklı zar hasarı hesperidinin antioksidan ve koruyucu etkilerinin farklı yönleri incelemiştir. Elde etikleri bulgulara göre H₂O₂ gibi oksidan moleküllerin toplanmasını sağlayarak hücre membranlarının ve oksidatif stres uyarımlı DNA kırıklarından koruduğunu göstermişlerdir.

Bir dizi çalışmada HSP'nin süperoksit anyonları, hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türlerini (ROS) ve Peroksinitrit, nitrik oksit radikalleri gibi reaktif nitrojen türlerini (RNS) nötralize ettiğini gösterilmiştir. (Garg ve ark. 2001, Kim ve ark. 2004, Wilmsen ve ark. 2005). Guazelli ve ark. (2021) hesperidinin miyeloperoksidaz aktivasyonunu baskılayarak ve glutatyon miktarını artırarak antioksidan etkinlik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Kang ve ark. (2011) LPS uyarımlı RAW hücre inflamasyonu modelinde içerisinde hesperidinde bulunan Flavonoid karışımının (nobiletin, Naringin ve Hsd), iNOS ve COX-2 mesajcı ribonükleik asit (mRNA) seviyelerini anlamlı düzeyde azaltarak ve özellikle NF-κB ve mitojenle aktive edilmiş protein kinazlar (MAPK) sinyal yollarının baskılayarak anti inflamatuvar etkinliğini ortaya koymuşlardır. Nrf2 aktivasyonu, oksidatif strese karşı savunmada önemli bir mekanizmadır. Nrf2 elektrofilik ajanların ve reaktif oksidanların detoksikasyonu ve eliminasyonunda yer alan antioksidan ve sitodefansif proteinler olan genlerin ekspresyonunu aktive eder (Nguyen ve ark. 2009).

Xin ve ark. (2020) hipobarik hipoksi modelinde hesperidinin Nrf-2'nin mRNA ve protein seviyelerini hipoksi grubuna göre anlamlı düzeyde arttırdığını tespit etmişlerdir. Bununla birlikte araştırmacılar hesperidinin yararlı etkisini Nrf-2/HO1 antioksidan sinyal yolağını uyararak gösterdiğini de rapor etmişlerdir. Yine Aly ve ark. (2017) diethylnitrosamine/carbon tetrachloride uyarımlı renal hasarda hesperidinin Nrf-2/HO1 antioksidan sinyal yolağındaki genlerin ekspresyon seviyelerini artırarak hücreleri koruduğunu göstermişlerdir. Elavarasan ve ark. (2012) yaşlılık oksidatif stres ilişkili modelde, hesperidinin özellikle kalp dokusunda Nrf-2 protein düzeyinde artışına bağlı olarak katalaz ve süperoksit dismutaz enzim aktivitelerini arttırarak antioksidan kapasite uyarımı ile hücreleri koruduğunu rapor etmişlerdir. Jain ve Parmar (2011) rat hava kesesi yangısı modelinde hesperidinin lipid peroksidasyonunu baskılarken, süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitesini arttırdığını, bununla birlikte indirgenmiş glutatyon ve nitrik oksiti

dokuda önemli düzeyde azalttığını göstermişlerdir. Bu çalışmada hesperidin, tedavi grubunda OSI değerini düşürerek ve Nrf-2 değerini artırarak antioksidan aktivite göstermiştir.

Literatürdeki çoğu çalışmada tibia longitudinal ekseninde örneklenmiştir (Smeltzer ve ark. 1997, Fukisima ve ark. 2005, Güzel ve ark. 2016). Chadha ve ark. (1999) yapmış oldukları bir tibia osteomyelit modelinde, tibianın büyüme plağına yakın lokasyonların enfekte olduğunu ve proksimal tibiadan kesitler alındığını ifade etmişlerdir. Bu nedenle çalışmamızda proksimal tibiayı iki ekseninde değerlendirebilmek için önce proksimal tibiadan transvers bir kesit aldıktan sonra tibia longitudinal olarak örnekledi. Osteomyelitin histopatolojik tanısında intramedüller akut inflamasyon, intramedüller apse formasyonları, intraosseöz kronik inflamasyon, fibrozis, periost reaksiyonu, kemik nekrozu, sekestre kemikler gibi bir çok parametre değerlendirilmektedir (Sybenga ve ark. 2019). Bu çalışmada bu parametreleri birarada değerlendiren ve skorlamayı objektif kriterlerle birlikte sunan Smeltzer ve ark. (1997) yaptıkları histopatolojik skorlama kullanıldı. Buna göre her bir denek için intraosseöz akut inflamasyon, intramedüller apse formasyonları, intraosseöz kronik inflamasyon, fibrozis, periosteal inflamasyon veya kemik nekrozunu değerlendirildi ve skorlandı. Histopatolojik değerlendirmede kontrol grubunda İAİ, İKİ, Pİ, KN görülmezken Sham grubunda ise inflamasyon ihmal edilebilir düzeyde hafifti. OM grubunda ise tüm deneklerde intramedüller apse oluşumu ile minimumdan şiddetliye kadar değişen akut inflamasyon, hafiften şiddetliye değişen oranlarda kronik inflamasyon, değişen oranlarda periosteal inflamasyon ve kemik nekrozu izlendi. OM grubunda bir denek hariç tüm deneklerde değişen oranda kemik nekrozu görüldü. OM grubunun toplam histopatolojik skoru, Kontrol ve Sham gruplarının toplam skorları ile anlamlı fark göstermesi bize osteomyelit modelinin oluşturulduğunu kanıtladı. Tedavi grubunda İAİ ve İKİ tüm deneklerde devam etmekle birlikte şiddeti OM grubuna göre daha hafif düzeydeydi. Tedavi grubunda 1 denekte hafif diğerlerinde orta ila şiddetli İAİ inflamasyon; 3 denekte minimal ila hafif İKİ, 5 denekte ise orta ila şiddetli İKİ izlendi, ancak intramedüller apse formasyonu veya belirgin fibrozis hiçbirinde görülmedi; kemik nekrozu ise sadece 2 denekte mevcuttu. Tedavi grubunun İAİ, İKİ, Pİ, KN ve toplam histopatolojik skorları OM grubunun skorlarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük olması bize hesperidinin inflamasyonu baskılayarak osteomyelit tedavisine katkıda bulunabileceğini göstermektedir.

Hesperidinin antiinflamatuvar, güçlü antioksidan ve antimikrobiyal etkinliği olduğu bilinmektedir (Yurtal ve ark. 2020). Osteomiyelitin belirtileri biyokimyasal, histopatolojik ve radyografik değişiklikler ile açıkça ortaya kondu. Osteomiyelitte hesperidin kullanımı ile ilgili in vitro çalışma (Kostić ve ark. 2020) yapılmış olmasına rağmen, in vivo çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma şimdiye kadarki literatürde hesperidinin osteomiyelit üzerinde tedavi edici etkisini araştıran ilk in vivo çalışmadır.



6. SONUÇ

Sonuç olarak, hesperidin histopatolojik olarak tedavi grubunda İAI, İKİ, Pİ ve KN'nu osteomyelit grubuna göre anlamlı oranda azaltmıştır. Biyokimyasal olarak tedavi grubunda inflamatuvar yolaklarda rol alan NF-κB'yi baskılayıp, Nrf-2'yi arttırarak görünür seviyede antiinflamatuvar etkinlik göstermiştir. Radyolojik olarak tedavi grubunda osteomyelit grubuna göre istatistiki olarak anlamlı olmasa da klinik anlamda önemli sayılabilecek düzeyde iyileşme göstermiştir. Bu veriler ışığında osteomyelitin kronik seyrini tedavi etmek ve hastalığın geleneksel tedaviye olan direncini kırabilmek için standart tedavi protokolüne eklenebileceği düşünülmektedir. Bu çalışma şimdiye kadar literatürde hesperidinin osteomyelit üzerinde tedavi edici etkisini araştıran ilk in vivo çalışma olup bulgularımızın osteomyelit tedavisi ile ilgili ileride planlanabilecek deneysel ve klinik çalışmalara yol gösterebileceği kanaatindeyiz.

7. KAYNAKLAR

1. **Alt V, Giannoudis PV.** Musculoskeletal infections–A global burden and a new subsection in injury. *Injury*, **2019**, 50(12):2152-2153.
2. **Aly MS, Galaly SR, Moustafa N, Mohammed HM, Khadrawy SM. ve ark.** Hesperidin protects against diethylnitrosamine/carbon tetrachloride-induced renal repercussions via up-regulation of Nrf2/HO-1 signaling and attenuation of oxidative stress. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **2017**, 7(11):7-14.
3. **An YH, Kang QK, Arciola CR.** Animal models of osteomyelitis. *The International Journal of Artificial Organs*, **2006**, 29(4):407-420.
4. **Asensi V, Montes AH, Valle E, Ocana MG, Astudillo A. ve ark.** The NOS3 (27-bp repeat, intron 4) polymorphism is associated with susceptibility to osteomyelitis. *Nitric Oxide*, **2007**, 16(1):44-53.
5. **Banji OJF, Banji D, Ch K.** Curcumin and hesperidin improve cognition by suppressing mitochondrial dysfunction and apoptosis induced by D-galactose in rat brain. *Food and Chemical Toxicology*, **2014**, 74:51-59.
6. **Bayliss L, Mahoney DJ, Monk P.** Normal bone physiology, remodeling and its hormonal regulation. *Surgery*, **2012**, 30(2):47-53.
7. **Beutler B, Cerami A.** Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. *Annual review of biochemistry*, **1988**, 57(1):505-518.
8. **Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O.** Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, **2012**, 5(1):9-19.
9. **Birt MC, Anderson DW, Toby EB, Wang J.** Osteomyelitis: recent advances in pathophysiology and therapeutic strategies. *Journal of orthopaedics*, **2017**, 14(1):45-52.
10. **Bondeson J, Foxwell B, Brennan F, Feldmann M.** Defining therapeutic targets by using adenovirus: blocking NF-kappaB inhibits both inflammatory and destructive mechanisms in rheumatoid synovium but spares antiinflammatory mediators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1999**, 96(10):5668-5673..
11. **Bryant T.** A manual for the practice of surgery. 4th ed., Henry Charles Lea Library Collection, Philadelphia, **1885**, s.917.
12. **Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R.** Bone biology. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, **1995**, 77(8):1256-1275.
13. **Bulut M, Altındağ A, Deveci Z, Kaya MC, Bülbül F. ve ark.** Elektrokonvulzif tedavi ve farmakoterapi ile tedavi edilen iki uçlu bozukluk hastalarında oksidatif parametreler. *Journal of Mood Disorders*, **2013**, 3(3):93-99.
14. **Calhoun JH, Manring MM, Shirliff M.** Osteomyelitis of the long bones. *In Seminars in Plastic Surgery*, **2009**, 23(02):59-72.
15. **Calzia E, Öter S, Muth CM, Radermacher P.** Evolving career of hyperbaric oxygen in sepsis: From augmentation of oxygen delivery to the modulation of the immune response. *Critical Care Medicine*, **2006**, 34(10):2693-2695.
16. **Carballo-Villalobos AI, González-Trujano ME, Pellicer F, López-Muñoz FJ.** Antihyperalgesic Effect of Hesperidin Improves with Diosmin in Experimental Neuropathic Pain. *BioMed Research International*, **2016**, 2016:1-12.
17. **Carek PJ, Dickerson LM, Sackier JM.** Diagnosis and management of osteomyelitis. *American Family Physician*, **2001**, 63(12):2413-2421.
18. **Chadha HS, Fitzgerald Jr RH, Wiater P, Sud S, Nasser S. ve ark.** Experimental acute hematogenous osteomyelitis in mice. I. Histopathological and immunological findings. *Journal of Orthopaedic Research*, **1999**, 17(3):376-381.
19. **Ciampolini J, Harding KG.** Pathophysiology of chronic bacterial osteomyelitis. Why do antibiotics fail so often? *Postgraduate Medical Journal*, **2000**, 76:479–483.
20. **Clarke B.** Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, **2008**, 3:S131-S139.
21. **Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa, I. ve ark.** Bap, a Staphylococcus aureus surface protein involved in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, **2001**, 183(9):2888-2896.

22. **Çimen MBY.** Flavonoidler ve Antioksidan özellikleri. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, **1999**, 19(5):296-304.
23. **de Araujo FP, Monaco M, Del Grosso M, Pirolo M, Visca P. ve ark.** Staphylococcus aureus clones causing osteomyelitis; a literature review (2000-2020). *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2021, 26:29-36
24. **Efstathopoulos N, Giamarellos-Bourboulis E, Kanellakopoulou K, Lazarettos I, Giannoudis P. ve ark.** Treatment of experimental osteomyelitis by methicillin resistant Staphylococcus aureus with bone cement system releasing grepafloxacin. *Injury*, **2008**, 39(12):1384-1390.
25. **Elavarasan J, Velusamy P, Ganesan T, Ramakrishnan SK, Rajasekaran D. ve ark.** Hesperidin-mediated expression of Nrf2 and upregulation of antioxidant status in senescent rat heart. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **2012**, 64(10):1472-1482.
26. **Emslie KR, Ozanne NR, Nade SML.** Acute haematogenous osteomyelitis: an experimental model. *The Journal of Pathology*, **1983**, 141(2):157-167.
27. **Erel O.** A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*, **2005**, 38(12):1103-1111.
28. **Foster TJ, Geoghegan JA.** *Staphylococcus aureus*. In: Molecular Medical Microbiology. 2st ed., Academic Press, Elsevier, United Kingdom, **2015**, s.655-674.
29. **Fritz JM, McDonald JR.** Osteomyelitis: approach to diagnosis and treatment. *The Physician and Sportsmedicine*, **2008**, 36(1):50-54.
30. **Fukushima N, Yokoyama K, Sasahara T, Dobashi Y, Itoman M.** Establishment of rat model of acute staphylococcal osteomyelitis: relationship between inoculation dose and development of osteomyelitis. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, **2005**, 125(3):169-176.
31. **Garg A, Garg S, Zaneveld LJD, Singla AK.** Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytotherapy research*, **2001**, 15(8):655-669.
32. **Gillaspay AF, Hickmon SG, Skinner RA, Thomas JR, Nelson CL. ve ark.** Role of the accessory gene regulator (agr) in pathogenesis of staphylococcal osteomyelitis. *Infection and immunity*, **1995**, 63(9):3373-3380.
33. **Grace D, Fetsch A.** *Staphylococcus aureus - A foodborne pathogen: Epidemiology, detection, characterization, prevention, and control: An overview*. In: Staphylococcus aureus. 1st ed., Academic Press, Elsevier, United Kingdom, **2018**, s.3-10.
34. **Gratz S, Béhé M, Boerman OC, Kunze E, Schulz H. ve ark.** 99mTc-E-selectin binding peptide for imaging acute osteomyelitis in a novel rat model. *Nuclear medicine communications*, **2001**, 22(9):1003-1013.
35. **Guazelli CF, Fattori V, Ferraz CR, Borghi SM, Casagrande R. ve ark.** Antioxidant and anti-inflammatory effects of hesperidin methyl chalcone in experimental ulcerative colitis. *Chemico-Biological Interactions*, **2021**, 333(2021):109315.
36. **Gunawan G, Setiyohadi B.** Diagnosis and management of osteomyelitis. *Indonesian Journal of Rheumatology*, **2010**, 2(2):5-9.
37. **Güzel Y, Golge UH, Goksel F, Vural A, Akcay M. ve ark.** The efficacy of boric acid used to treat experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an in vivo study. *Biological trace element research*, **2016**, 173(2):384-389.
38. **Iskender H, Dokumacioglu E, Sen TM, Ince I, Kanbay Y. ve ark.** The effect of hesperidin and quercetin on oxidative stress, NF-κB and SIRT1 levels in a STZ-induced experimental diabetes model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **2017**, 90(2017):500-508.
39. **İnsal B, Pişkin İ.** Kemik Dokusunun Fizyolojisi. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, **2017**, 28(1):28-32.
40. **Jain M, Parmar HS.** Evaluation of antioxidative and anti-inflammatory potential of hesperidin and naringin on the rat air pouch model of inflammation. *Inflammation research*, **2011**, 60(5):483-491.
41. **Jyoti A, Singh S, Mukhopadhyay B, Gavel R, Mishra SP.** Free radicals and antioxidant status in chronic osteomyelitis patients: a case control study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, **2015**, 9(4):BC08-BC10.
42. **Kadry AA, Al-Suwayeh SA, Abd-Allah AR, Bayomi MA.** Treatment of experimental osteomyelitis by liposomal antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2004**, 54(6):1103-1108.
43. **Kalpna KB, Srinivasan M, Menon VP.** Evaluation of antioxidant activity of hesperidin and its protective effect on H₂O₂ induced oxidative damage on pBR322 DNA and RBC cellular membrane. *Molecular and cellular biochemistry*, **2009**, 323(1):21-29.

44. **Kamaraj S, Anandakumar P, Jagan S, Ramakrishnan G, Devaki T.** Modulatory effect of hesperidin on benzo (a) pyrene induced experimental lung carcinogenesis with reference to COX-2, MMP-2 and MMP-9. *European journal of pharmacology*, **2010**, 649(1-3):320-327.
45. **Kang SR, Park KI, Park HS, Lee DH, Kim JA. ve ark.** Anti-inflammatory effect of flavonoids isolated from Korea Citrus aurantium L. on lipopolysaccharide-induced mouse macrophage RAW 264.7 cells by blocking of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling pathways. *Food Chemistry*, **2011**, 129(4):1721-1728.
46. **Kaur G, Tirkey N, Chopra K.** Beneficial effect of hesperidin on lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity. *Toxicology*, **2006**, 226(2-3):152-160.
47. **Kawaguchi K, Kikuchi SI, Hasunuma R, Maruyama H, Yoshikawa T. ve ark.** A citrus flavonoid hesperidin suppresses infection-induced endotoxin shock in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **2004**, 27(5):679-683.
48. **Kim JY, Jung KJ, Choi JS, Chung HY.** Hesperetin: a potent antioxidant against peroxynitrite. *Free radical research*, **2004**, 38(7):761-769.
49. **Kini U, Nandeesh BN.** *Physiology of bone formation, remodeling, and metabolism*. In: Radionuclide and Hybrid Bone Imaging. 1st ed., Springer, Germany, **2012**, s.29-55.
50. **Kostić M, Ivanov M, Stojković D, Ćirić A, Soković M.** Antibacterial and antibiofilm activity of selected polyphenolic compounds: An in vitro study on Staphylococcus aureus. *Lekovite Sirovine*, **2020**, 40:57-61.
51. **Kuntić V, Brborić J, Holclajtner-Antunović I, Uskoković-Marković S.** Evaluating the bioactive effects of flavonoid hesperidin: A new literature data survey. *Vojnosanitetski pregled*, **2014**, 71(1):60-65.
52. **Lebreton M.** Sur la matiere cristalline des orangettes, et analyse de ces fruits non encore developpes, famille des. *Hesperidees journal de Pharmacie et de sciences accessoires*, **1828**, 14:377.
53. **Lew DP, Waldvogel FA.** Osteomyelitis. *New England Journal of Medicine*, **1997**, 336(14):999-1007.
54. **Lew DP, Waldvogel FA.** Osteomyelitis. *The Lancet*, **2004**, 364(9431):369-379.
55. **Li C, Schluesener H.** Health-promoting effects of the citrus flavanone hesperidin. *Critical reviews in food science and nutrition*, **2017**, 57(3):613-631.
56. **Li, Q. I, Verma M.** NF-kappaB regulation in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, **2002**, 2(10):725-734.
57. **Lima ALL, Oliveira PR, Carvalho VC, Cimerman S, Savio E.** Recommendations for the treatment of osteomyelitis. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, **2014**, 18(5):526-534.
58. **Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC.** NF- κ B signaling in inflammation. *Signal transduction and targeted therapy*, **2017**, 2(1):1-9.
59. **Lovati AB, Romanò CL, Bottagisio M, Monti L, De Vecchi E. ve ark.** Modeling Staphylococcus epidermidis-induced non-unions: subclinical and clinical evidence in rats. *PLoS One*, **2016**, 11(1):e0147447.
60. **Mackowiak PA, Jones SR, Smith JW.** Diagnostic value of sinus-tract cultures in chronic osteomyelitis. *Jama*, **1978**, 239(26):2772-2775.
61. **Massaccesi L, Galliera E, Pellegrini A, Banfi G, Corsi Romanelli MM.** Osteomyelitis, Oxidative Stress and Related Biomarkers. *Antioxidants*, **2022**, 11(6):1061.
62. **May C.** Management of bacterial osteomyelitis in dogs and cats. *In Practice*, **2002**, 24(6):330-337.
63. **Maynard RL, Downes N.** *Vertebrae, Ribs, Sternum, Pectoral and Pelvic Girdles, and Bones of the Limbs*. In: Anatomy and Histology of the Laboratory rat in Toxicology and Biomedical Research. Academic Press, Elsevier, United Kingdom, **2019**, s. 23-39.
64. **Mendel V, Simanowski HJ, Scholz HC, Heymann H.** Therapy with gentamicin-PMMA beads, gentamicin-collagen sponge, and cefazolin for experimental osteomyelitis due to Staphylococcus aureus in rats. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*, **2005**, 125(6):363-368.
65. **Mendel V, Simanowski HJ, Scholz HC.** Synergy of HBO[^] sub 2[^] and a local antibiotic carrier for experimental osteomyelitis due to staphylococcus aureus in rats. *Undersea & Hyperbaric Medicine*, **2004**, 31(4):407.
66. **Mustafa M, Yusof S, Iftikhar M.** Osteomyelitis: pathogenesis, clinical and therapeutic challenge. *International Journal of Medicine and Pharmaceutical Sciences*, **2014**, 4(1):9-18.
67. **Nabavi SF, Barber AJ, Spagnuolo C, Russo GL, Daglia M. ve ark.** Nrf2 as molecular target for polyphenols: A novel therapeutic strategy in diabetic retinopathy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, **2016**, 53(5):293-312.
68. **Nennig SE, Schank J.** The role of NF κ B in drug addiction: beyond inflammation. *Alcohol and Alcoholism*, **2017**, 52(2):172-179.

69. **Nguyen T, Nioi P, Pickett CB.** The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *Journal of biological chemistry*, **2009**, 284(20):13291-13295.
70. **Norden C, Gillespie WJ, Nade S.** *Clinical syndromes*. In: Infections in bone and joints, Blackwell, USA, **1994**, s. 137–387.
71. **Norden CW, Kennedy E.** Experimental osteomyelitis. I. A description of the model. *The Journal of infectious diseases*, **1970**, 122(5):410-418.
72. **Nostro A, Cellini L, Ginestra G, D'Arrigo M, di Giulio M. ve ark.** Staphylococcal biofilm formation as affected by type acidulant. *Apmis*, **2014**, 122(7):648-653.
73. **Ondusko DS, Nolt D.** Staphylococcus aureus. *Pediatrics in review*, **2018**, 39(6):287-298.
74. **Perry CR, Pearson RL, Miller GA.** Accuracy of cultures of material from swabbing of the superficial aspect of the wound and needle biopsy in the preoperative assessment of osteomyelitis. *The Journal of Bone and Joint surgery. American Volume*, **1991**, 73(5):745-749.
75. **Pinho-Ribeiro FA, Hohmann MS, Borghi SM, Zarpelon AC, Guazelli CF. ve ark.** Protective effects of the flavonoid hesperidin methyl chalcone in inflammation and pain in mice: role of TRPV1, oxidative stress, cytokines and NF- κ B. *Chemico-biological interactions*, **2015**, 228:88-99.
76. **Polat N, Ciftci O, Cetin A, Yilmaz T.** Toxic effects of systemic cisplatin on rat eyes and the protective effect of hesperidin against this toxicity. *Cutaneous and ocular toxicology*, **2016**, 35(1):1-7.
77. **Ralston SH, Ho LP, Helfrich MH, Grabowski PS, Johnston PW. ve ark.** Nitric oxide: A cytokine-induced regulator of bone resorption. *Journal of Bone and Mineral Research*, **1995**, 10(7):1040-1049.
78. **Rezaeyan A, Haddadi GH, Hosseinzadeh M, Moradi M, Najafi M.** Radioprotective effects of hesperidin on oxidative damages and histopathological changes induced by X-irradiation in rats heart tissue. *Journal of Medical Physics/Association of Medical Physicists of India*, **2016**, 41(3):182.
79. **Rissing JP, Buxton TB, Fisher J, Harris R, Shockley RK.** Arachidonic acid facilitates experimental chronic osteomyelitis in rats. *Infection and immunity*, **1985**, 49(1):141-144.
80. **Roesgen M, Hierholzer G, Hax PM.** Post-traumatic osteomyelitis. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*, **1989**, 108(1):1-9.
81. **Schmidt AH, Swiontkowski MF.** Pathophysiology of infections after internal fixation of fractures. *JAAOS-Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, **2000**, 8(5):285-291.
82. **Schmitt SK.** Osteomyelitis. *Infectious Disease Clinics*, **2017**, 31(2):325-338.
83. **Sethi S, Thormann U, Sommer U, Stötzel S, Mohamed W. ve ark.** Impact of prophylactic CpG Oligodeoxynucleotide application on implant-associated Staphylococcus aureus bone infection. *Bone*, **2015**, 78:194-202.
84. **Shrivastava M, Kar V, Shrivastava S.** Cyclophosphamide altered the myocardial marker enzymes: Protection provoked by Hesperidin in Rats. *International Journal of Phytomedicine*, **2013**, 5(2):141.
85. **Sia IG, Berbari EF.** Osteomyelitis. *Best practice & research Clinical rheumatology*, **2006**, 20(6):1065-1081.
86. **Smeltzer MS, Thomas JR, Hickraon SG, Skinner RA, Nelson CL.** Characterization of a rabbit model of staphylococcal osteomyelitis. *Journal of Orthopaedic Research*, **1997**, 15(3):414-421.
87. **Song Y, Hao D, Jiang H, Huang M, Du Q. ve ark.** Nrf2 regulates Chi3l1 to suppress inflammation and improve post-traumatic osteoarthritis. *Journal of Inflammation Research*, **2021**, 14:4079-4088.
88. **Subramanian P, Anandan R, Jayapalan JJ, Hashim OH.** Hesperidin protects gentamicin-induced nephrotoxicity via Nrf2/HO-1 signaling and inhibits inflammation mediated by NF- κ B in rats. *Journal of functional foods*, **2015**, 13:89-99.
89. **Svoboda MSJ, Bice TG, Gooden HA, Brooks DE, Thomas DB. ve ark.** Comparison of bulb syringe and pulsed lavage irrigation with use of a bioluminescent musculoskeletal wound model. *JBJS*, **2006**, 88(10):2167-2174.
90. **Sybenga AB, Jupiter DC, Speights VO, Rao A.** Diagnosing osteomyelitis: a histology guide for pathologists. *The Journal of Foot and Ankle Surgery*, **2020**, 59(1):75-85.
91. **Taylor TA, Unakal CG.** Staphylococcus aureus. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing. **2021**, [Internet]. Erişim tarihi: 06.09.2022, Erişim linki: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>
92. **Tetsworth K, Cierny III G.** Osteomyelitis debridement techniques. *Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007)*, **1999**, 360:87-96.
93. **Trebe R, Milosev I, Kovac S, Mikek M, Pisot V.** Poor results from the isoelectric total hip replacement: 14-17-year follow-up of 149 cementless prostheses. *Acta Orthopaedica*, **2005**, 76(2):169-176.
94. **Tzelepi V, Tsamandas AC, Zolota V, Scopa CD.** *Bone anatomy, physiology and function*. In: Bone Metastases: A translational and clinical approach. Springer, Netherlands, **2009**, s.3-30.
95. **Van'T Hof RJ, Ralston SH.** Nitric oxide and bone. *Immunology*, **2001**, 103(3):255-261.

96. **Waldvogel FA, Medoff Swartz MN.** Osteomyelitis: a review of clinical features, therapeutic considerations, and unusual aspects. *The New England Journal of Medicine*, **1970**, 282:198-206.
97. **Wang N, Liang H, Zen K.** Molecular mechanisms that influence the macrophage M1–M2 polarization balance. *Frontiers in immunology*, **2014**, 5:614.
98. **Wang Y, Lin Y, Cheng C, Chen P, Zhang P. ve ark.** NF- κ B/TWIST1 mediates migration and phagocytosis of macrophages in the mice model of implant-associated *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *Frontiers in microbiology*, **2020**, 11:1301.
99. **Wilmsen PK, Spada DS, Salvador M.** Antioxidant activity of the flavonoid hesperidin in chemical and biological systems. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2005**, 53(12):4757-4761.
100. **Xiao S, Liu W, Bi J, Liu S, Zhao H. ve ark.** Anti-inflammatory effect of hesperidin enhances chondrogenesis of human mesenchymal stem cells for cartilage tissue repair. *Journal of inflammation*, **2018**, 15(1):1-8.
101. **Xin X, Li Y, Liu H.** Hesperidin ameliorates hypobaric hypoxia-induced retinal impairment through activation of Nrf2/HO-1 pathway and inhibition of apoptosis. *Scientific reports*, **2020**, 10(1):1-10.
102. **Yurtal Z, Altug ME, Unsaldi E, Secinti IE, Kucukgul A.** Investigation of Neuroprotective and Therapeutic Effects of Hesperidin in Experimental Spinal Cord Injury. *Turkish Neurosurgery*, **2020**, 30(6):899-906.
103. **Yüksekdağ ZN, Baltacı N.** *Staphylococcus aureus* türlerinde biyofilm ve biyofilm oluşumundan sorumlu genler. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, **2013**, 43(3):77-83.
104. **Yüksel D.** Acute multifocal osteomyelitis: Tc-99m Methylendiphosphanate, Tc-99m HMPAO leucocytes and Tc-99m (V) dimercaptosuccinic acid imaging. *Pamukkale Tıp Dergisi*, **2021**, 14(2):496-498.
105. **Zhang F, Wang B, Liu S, Chen Y, Lin Y. ve ark.** *Bacillus subtilis* revives conventional antibiotics against *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *Microbial Cell Factories*, **2021**, 20(1):1-15.
106. **Zuluaga AF, Galvis W, Saldarriaga JG, Agudelo M, Salazar BE. ve ark.** Etiologic diagnosis of chronic osteomyelitis: a prospective study. *Archives of internal medicine*, **2006**, 166(1):95-100.

ÖZGEÇMİŞ

Halil İsmail ÖNAL ilk, orta ve lise öğrenimini Vali Teoman İlköğretim Okulu ve Atatürk Lisesi'nde tamamladı. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde 2003-2009 yılları arasında eğitim aldı. 2009 yılında kanatlı sektöründe çalışmaya başladı. 2020 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veterinerlik Cerrahisi Anabilim Dalında yüksek lisansa eğitime başladı. Kanatlı sektöründe hizmet vermeye devam etmekte olup evli ve iki çocuk babasıdır.

