



T.C.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL RAT FEMUR KAYNAMAMA MODELİNDE
LOKAL UYGULANAN SİMVASTATİNİN ETKİLERİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Atilla KOÇER

KAYSERİ – 2010



T.C.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL RAT FEMUR KAYNAMAMA MODELİNDE
LOKAL UYGULANAN SİMVASTATİNİN ETKİLERİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Atilla KOÇER

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Mithat ÖNER

KAYSERİ – 2010

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini aktararak büyük emek harcayan anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Mahmut ARGÜN' e, değerli hocalarım Prof. Dr. Ali BAKTIR, Prof. Dr. Cemil Yıldırım TÜRK, Prof. Dr. Mahmut MUTLU, Prof. Dr. Sinan KARAOĞLU, Prof. Dr. Şevki ERDEM, Doç. Dr. Mehmet HALICI, Doç. Dr. Fuat DUYGULU, Yrd. Doç. Dr. Ahmet GÜNEY ve bu tez çalışmasını bizzat destekleyerek yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Mithat ÖNER' e teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Ayrıca tezimin biyokimyasal parametre çalışmalarında Doç. Dr. Gülden BAŞKOL' a, patoloji çalışmalarında Doç. Dr. Kemal DENİZ' e, istatistik çalışmalarında Ferhan ELMALI' ya, tezin deneysel kısmında çalışmalara yardım eden araştırma görevlisi arkadaşlarıma, bana her konuda destek veren, sıkıntılara katlanan eşim Uzm. Dr. Derya KOÇER ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
KISALTMALAR	IV
TABLO LİSTESİ.....	VI
ŞEKİL LİSTESİ.....	VII
ÖZET.....	IX
ABSTRACT	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. KIRIK İYİLEŞMESİ.....	3
2.2. KAYNAMAMA VE PSÖDOARTROZ TANIMI.....	6
2.3. STATİNLER.....	9
2.4. OSTEOKALSİN TANIMI	14
2.5. KEMİK SPESİFİK ALKALEN FOSFATAZ TANIMI.....	16
2.6. KOLESTEROL TANIMI	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. DENEY HAYVANLARI VE ÇALIŞMA GRUPLARI.....	18
3.2. HAZIRLIK VE AMELİYAT	19
3.3. SİMVASTATİNİN HAZIRLANIŞI VE UYGULANMASI.....	24
3.4. DENEY HAYVANLARININ SAKRİFİYE EDİLMESİ	24
3.5. RADYOLOJİK DEĞERLENDİRME.....	24
3.6. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME	25
3.7. BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME	26
3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	31

4. BULGULAR.....	32
4.1. RADYOLOJİ SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI	32
4.2. HİSTOPATOLOJİ SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI	34
4.3. BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİN KARŞILAŞTIRILMASI	37
5. TARTIŞMA.....	39
6. SONUÇLAR.....	47
7. KAYNAKLAR	49
TEZ ONAY SAYFASI.....	55

KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ALP	: Alkalen fosfataz
BAP	: Kemik spesifik alkalen fosfataz
BMP-2	: Kemik morfogenetik protein-2
°C	: Santigrad derece
CK	: Kreatin kinaz
DEXA	: Dual enerji x-ray absorpsiometri
dL	: Desilitre
DMSO	: Dimetil sulfoksit
FDA	: United States Food and Drug Administration
Gla	: γ -karboksile glutamik asit
gr	: Gram
HDL	: Yüksek dansiteli lipoprotein
HE	: Hemotoksilen eozin
HMG-CoA	: 3-Hidroksi 3-Metil Glutaril koenzim A
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
H ₂ SO ₄	: Sülfürik asit
K	: Kontrol grubu
KCl	: Potasyum klorür
kDa	: Kilodalton
kg	: Kilogram
Kr Teli	: Kirschner Teli
LDL	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
MCP-1	: Monosit kemoatraktan protein-1

mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
NF- κ B	: Nükleer faktör kappa-B
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
NO	: Nitrik oksit
p	: İstatistiksel olarak anlamlı
S	: Simvastatin grubu
SA-HRP	: Streptavidin-Horseradish Peroxidase
SF	: Serum fizyolojik
SPSS	: Statical package for social science
ss	: Standart sapma
TGF-b	: Transforming büyüme faktör-b
TMB	: 3,3',5,5'-Tetrametil Benzidin Dihidroklorid
USA	: United States of America
vb.	: Ve benzeri
VLDL	: Çok düşük dansiteli lipoprotein
χ^2	: Ki kare testi
μ g	: Mikrogram
μ L	: Mikrolitre
μ m	: Mikrometre

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Goldberg sınıflaması	25
Tablo 2. Histolojik skorlama sistemi.....	26
Tablo 3. Osteokalsin analizi	28
Tablo 4. BAP analizi	30
Tablo 5. Radyoloji istatistik sonuçları.....	33
Tablo 6. Histopatoloji istatistik sonuçları.....	34
Tablo 7. Biyokimya istatistik sonuçları.....	38

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. İnflamasyon dönemi.....	6
Şekil 2. Tamir dönemi	6
Şekil 3. Yeniden şekillenme dönemi	6
Şekil 4. Hipervasküler kaynamamış kırıklar	8
Şekil 5. Avasküler kaynamamış kırıklar	8
Şekil 6. Statinlerin kimyasal yapısı	10
Şekil 7. Osteokalsinin tipleri	15
Şekil 8. Kolesterolün kimyasal yapısı	17
Şekil 9. Deneklerin traş edilmesi.....	20
Şekil 10. Deneklerin ameliyat masasına alınışı.....	20
Şekil 11. Deneklerin boyanması ve steril örtülmesi.....	21
Şekil 12. Cilt insizyonu.....	21
Şekil 13. Kirschner teli ile femurun tespiti	22
Şekil 14. Gap aralığının elektronik kumpas ile ölçümü	22
Şekil 15. Femurdaki gap korunacak şekilde staple çivisiyle tespit	23
Şekil 16. Kasın dikilmesi	23
Şekil 17. Deneklere röntgen çekilmesi	25
Şekil 18. Total kolesterol analizi.....	27
Şekil 19. Osteokalsin standart grafiği.....	28
Şekil 20. BAP standart grafiği.....	30
Şekil 21. K ₄ grubundan bir radyografi.....	33
Şekil 22. S ₈ grubundan bir radyografi.....	34
Şekil 23. K ₄ grubundan alınan preparatta fibröz dokunun mikroskopik olarak görünümü.....	35

Şekil 24. K ₈ grubundan alınan preparatta mikroskopik olarak az miktarda kırık dökü ve fibröz doku görünümü	36
Şekil 25. S ₄ grubundan alınan preparatta mikroskopik olarak immatür kemik doku görünümü	36
Şekil 26. S ₈ grubundan alınan preparatta matür kemik doku görünümü	37

DENEYSEL RAT FEMUR KAYNAMAMA MODELİNDE LOKAL UYGULANAN SİMVASTATİNİN ETKİLERİ

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı, rat femurunda deneysel olarak oluşturulan kaynamama üzerine lokal olarak uygulanan simvastatinin etkilerini değerlendirmektir.

Materyal ve metod: Otuziki adet erkek Wistar-albino türü rat bu çalışmaya dahil edildi. Ratlar eşit olarak 4 gruba ayrıldı: Grup K₄, Grup K₈ (kontrol grupları), Grup S₄ ve Grup S₈ (çalışma grupları). Anestezi uygulandıktan sonra ratların sağ femurları osteotomize edildi. Osteotomi hattı elektronik kumpas yardımıyla 1,8 mm gap kalacak şekilde intramedüller Kirschner (Kr) teli ve staple çivisi ile tespit edildi. On haftalık bekleme süresi sonunda, tüm deneklerdeki kaynamama radyolojik olarak doğrulandı. Kontrol grubuna 1 mL/gün serum fizyolojik (SF), çalışma grubuna ise 10 mg/kg/gün simvastatin kaynamama sahasına lokal olarak bir hafta süreyle uygulandı. K₄ ve S₄ grupları tedavi bitiminden 4 hafta sonra sakrifiye edildi. K₈ ve S₈ grupları tedavi bitiminden 8 hafta sonra sakrifiye edildi. Sakrifikasyon öncesi biyokimyasal çalışmalar için intrakardiak kan örnekleri alındı ve radyografileri çekildi. Sakrifikasyon sonrası histopatolojik değerlendirme için ratların sağ femurları ayrıldı.

Bulgular: İyileşme radyolojik olarak değerlendirildiğinde, kontrol ve çalışma grubu arasında anlamlı fark olduğu görüldü. Simvastatinin sistemik etkinliği serum total kolesterol seviyesi ölçülerek gösterildi. Kemik spesifik alkalen fosfataz (BAP) ve osteokalsin değerleri, çalışma grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu. Histopatolojik değerlendirmede, çalışma grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede iyileşme görüldü.

Sonuç: Bu bulgulara göre, rat femur kaynamama modelinde, lokal olarak uygulanan simvastatinin, biyokimyasal, radyolojik ve histopatolojik olarak iyileşme üzerine olumlu etki gösterdiği tespit edildi.

Anahtar kelimeler: femur, kaynamama, rat, simvastatin.

THE EFFECTS OF LOCALLY APPLIED SIMVASTATIN ON THE EXPERIMENTAL RAT FEMUR NON-UNION MODEL

ABSTRACT

Purpose: The aim of this study was to assess the effects of locally applied simvastatin on non-union that was performed experimentally on rat femur.

Materials and Methods: Thirtytwo male Wistar-Albino rats were included in this study. Rats were randomly divided into four equal groups as follows: Group K₄, Group K₈ (control groups), Group S₄ and Group S₈ (study groups). Right femurs of rats were osteotomized after anaesthesia was given. Osteotomized femurs of rats were fixed by Kirschner (Kr) wires and staple nail after 1,8 mm gap was performed for each rat by checking with electronical compass. At the end of 10th week, non-union of each femur was confirmed radiographically. One mL/day of physiological serum was locally applied to the non-union area of control groups and 10 mg/kg/day of simvastatin was locally applied to the non-union area of study groups for a week. K₄ and S₄ groups were sacrificed four week after the end of the local treatment. K₈ and S₈ groups were sacrificed eight week after the end of the local treatment. Before the sacrifice, intracardiac blood samples were taken for biochemical analysis, and radiography were taken. After the sacrifice, right femurs of rats were taken for histopathological evaluation.

Results: There were significant differences between the control and study groups when evaluated radiologically. Systemic efficiency of simvastatin was shown by measuring serum total cholesterol levels. Significantly higher level of bone specific alkaline phosphatase (BAP) and osteocalcine values were found in study groups than those of controls. There was significant healing in study groups when compared with the controls histopathologically.

Conclusion: These results show that local application of simvastatin produces beneficial effects biochemical, radiological and histopathologically on rat femur non-union model.

Keywords: femur, non-union, rat, simvastatin

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kazalarla oluşan yaralanmalar, Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) 1-34 yaş arası ölümlerin en sık sebebidir ve 34 yaş üstü ölümlerin en sık on nedeni arasındadır. ABD' de her yıl 33 milyon insanda kas iskelet sistemi yaralanması görülmekte ve bu yaralanmaların 6.2 milyonunda kırık izlenmektedir (1).

Ortopedik girişimler ve tıbbi teknolojideki hızlı ilerlemeye rağmen bazı kırıkların iyileşmesi istenildiği gibi olmamaktadır. İyileşme zamanında uzama veya kaynamama durumları görülebilmektedir (1).

Değişik zamanlarda yapılan çalışmalarda, araştırmacılar kırık iyileşmesini hızlandırmak, kaynama gecikmesini ve kaynamama durumlarını ortadan kaldırmak için çok çeşitli çalışmalar ortaya koymuşlardır (1). Bunlardan biri de statin grubu ilaçların kemik doku üzerinde kullanılmasıdır.

Statin grubu ilaçlar (simvastatin, lovastatin, atorvastatin, vb.) kolesterol sentezinin hız kısıtlayıcı basamağı olan 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) redüktaz enzimini inhibe ederek kolesterol seviyesini düşürmek amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. Ateroskleroz sonucu oluşan iskemik kalp hastalıklarında kolesterol seviyesinin yüksek oluşu kolesterol düşürücü ilaçların bu alanda kullanımını artırmaktadır (2).

Lokal olarak kemik dokuya uygulanan statin grubu ilaçların hayvan modellerinde biyolojik etki oluşturduğu ve özellikle trabeküler kemik volümünde ve kemik formasyonunda artışa neden olduğu otörler tarafından belirtilmiştir (3).

Yapılan başka çalışmalarda, statin grubu ilaçların osteoklastları baskıladığı ve osteoblastları uyardığı bu mekanizma üzerinden de kemik tamirini indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca statinlerin kemik mineral dansitesini artırdığı, osteoporoz ve kırık riskini azalttığı da bildirilmiştir (4).

Yapılan literatür taramasında kaynamama durumundan sonra lokal olarak simvastatin uygulanan başka bir çalışma yoktur. Bu çalışma ile non-union sahasına uygulanan simvastatinin oluşturduğu lokal etkilerin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KIRIK İYİLEŞMESİ

Kırık iyileşmesi pek çok faktörden etkilenir. Özellikle de kan akımı, kırık iyileşmesinin her aşamasında etkili en önemli faktördür. Travma sonrası kırık bölgesini besleyen damarlar hasar görür ve kan akımı azalır. Kan akımında saatler ve günler içinde artış meydana gelir ve bu artış 2. haftada en yüksek düzeye ulaşır. Kan akımı kırık sonrası 3-5. aylarda normale döner. Bunun dışında kırık iyileşmesini etkileyen lokal ve sistemik olmak üzere pek çok faktör mevcuttur (5,6).

a) Lokal faktörler:

1. Kemiğin tipi
2. Kemiğin denerve olması
3. Enfeksiyon varlığı
4. Tümöral doku varlığı
5. Radyasyon nekrozu
6. Kırığın tipi
7. Vasküler hasar
8. Kırığın lokalizasyonu
9. Tespitin tipi ve şekli
10. Kırık parçaları arasındaki temas

b) Sistemik faktörler:

1. Hastanın yaşı
2. Aktivite seviyesi
3. Beslenme durumu
4. Hormonal faktörler (Büyüme hormonu, steroid, tiroid-paratroid hormonu, kalsitonin, östrojen, androjen)
5. Vitamin eksikliği
6. Diabetes mellitus
7. Anemi
8. Nikotin, alkol kullanımı
9. Merkezi sinir sistemi travması
10. Hiperoksi
11. Çeşitli ilaçlar (Non-steroidal antiinflatuarlar, kalsiyum kanal blokerleri, tetrasiklin, antikoagülanlar, fenitoin)

Kırık iyileşmesi primer ve sekonder olmak üzere 2 ana grupta incelenir. Primer kemik iyileşmesi kırık uçları anatomik olarak karşı karşıya gelip kortikal devamlılığın sağlandığı ve internal sıkı tespitinin yapıldığı durumlarda meydana gelirken, sekonder iyileşmede periost ve çevre yumuşak doku tarafından oluşturulan kallus dokusu ön plandadır. Radyolojik olarak primer kemik iyileşmesinde kallus görülmezken, sekonder kemik iyileşmede kallus formasyonu görülür (7-9).

Kırık iyileşmesi birbirinden keskin sınırlarla ayrılmamakla beraber 3 ana dönemde incelenir (7-9).

- İnflamasyon dönemi
- Tamir dönemi
- Yeniden şekillenme (remodeling) dönemi

2.1.1. İnflamasyon dönemi

İlk 2 gün içerisinde kırık uçlarından, yaralanan periost ve çevre yumuşak dokulardan kanama sonucu kırık hematomu oluşur. Bu süreç yaklaşık olarak 5. güne kadar

devam eder. Kırık hematomu, büyüme faktörleri salgılayabilen hematopoetik hücreler içerir. Kırık uçları arasında 2-5. günlerde fibrin içeren granülasyon dokusu (organize hematoma) oluşur. Organize hematoma fazla miktarda inflamatuvar hücre içerir (Şekil 1).

2.1.2. Tamir dönemi

Bu devrede organize hematoma çevresindeki damarlardan fibroblast infiltrasyonu gelişerek osteoblastlara farklılaşır. Osteoblastlar 7 gün içinde immatür vaskülarize kallus dokusunu oluşturur. Bu döneme “fibröz kallus dönemi” denir. Oluşan fibröz doku kırık dokusu ve genç kemik fibrillerinden oluşur. Ortamda yeterli oksijen varsa kemik iyileşmesi gerçekleşir. Zamanla kırık dokusu belirginleşir ve bu döneme “kırık dokusu (kartilajinöz kallus) dönemi” denir. Yaklaşık 40 gün sonra kalsiyum hidroksiapatit kristallerinin katılımıyla sert kemik dokusu oluşur (Şekil 2).

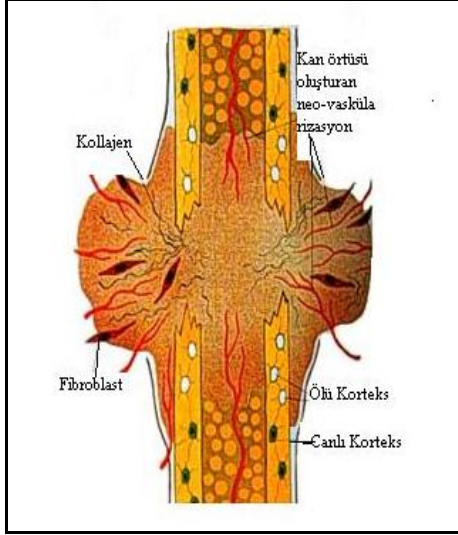
Kırık uçları devamlılığını kaybetmiş ise köprü kallusu endokondral ossifikasyon ile oluşurken, sert kallus intramembranöz ossifikasyon ile oluşur.

Endokondral kemikleşme: Kırık dokusu üzerinden kemik gelişimi olarak bilinir. Mezenkimal hücreler kırık dokusu matrisini sentezleyerek kondrositlere dönüşür. Matrisin mineralizasyonu ve anjiogenezisi takiben kemik öncül hücreler görülmeye başlar. Bu öncül hücreler sonradan osteoblastlara dönüşür. Bu dönemde osteoklastik ve osteoblastik aktivite devam etmektedir.

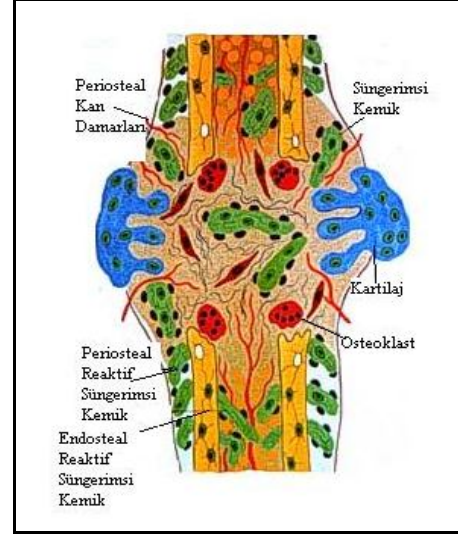
Intramembranöz kemikleşme: Kırık uçlarından uzakta olur. Sert kallus oluşumuna yol açar. Bu tip kemikleşmede kırık dokusu oluşum dönemi yoktur. Kırıktan bir hafta sonra kallusta ve periost altında intramembranöz kemikleşme görülebilir. İkinci hafta içinde kırık bölgesinde görülen kırık dokusu zamanla kalsifiye olur. Yumuşak ve sert formda görülen kallusun kalsifikasyonu için matris proteolitik enzimlerle parçalanmalıdır. İkinci haftanın sonunda alkalen fosfataz (ALP) aktivitesi en üst düzeye çıkar. Sonuç olarak kırık dokusu kalsifiye olur ve oluşan kan damarları kallus içerisine doğru büyür. Kırık sonrası, intramembranöz kemikleşmeye ait olan proliferatif dönem 2. haftanın sonunda azalırken, kırık dokusu oluşumunun ön planda olduğu endokondral iyileşme dönemi başlar (1,9,10).

2.1.3. Yeniden şekillenme (remodeling) dönemi

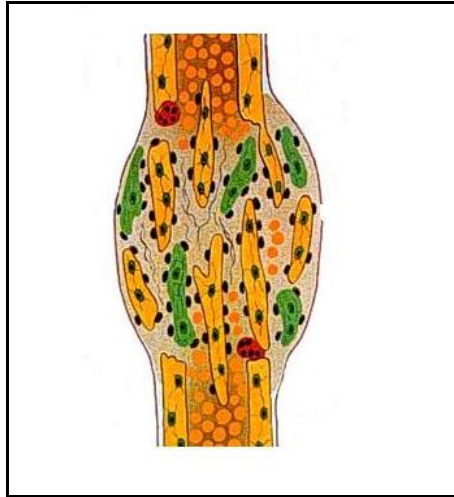
Bu süreç tamir dönemi ortalarında başlar ve kırık klinik olarak iyileştikten sonra yıllarca sürebilir. Kırık iyileşmesinin en son ve en uzun dönemidir. Aynı anda osteoblastik ve osteoklastik aktivite ile hem yeni kemik oluşur hem de oluşan bu yeni kemiğin kendine has trabeküler yapısı şekillenir (Şekil 3).



Şekil 1. İnflamasyon dönemi



Şekil 2. Tamir dönemi



Şekil 3. Yeniden şekillenme dönemi

2.2. NON-UNİON VE PSÖDOARTROZ TANIMI

Cave' nin 1960 yılında tanımladığı non-union, kaynama durması olarak tarif edilmektedir (11). Kaynamamış kemiğin tanısı, klinik veya radyolojik olarak

kanıtlanması gerekir. Bir kemik için non-uniondan bahsetmek, iyileşmenin durduğunu veya kaynamanın büyük olasılıkla olmayacağını ifade etmektir. 1986’ da United States Food and Drug Administration (FDA) panelinde “yaralanmadan sonra minimum 9 ay geçmesi ve bu süreçte kırığın 3 ay boyunca herhangi görülebilir kaynama belirtisi göstermemesi durumu” kaynamamış kırık olarak tarif edilmektedir. Fakat bu kriter her kırıkta uygulanamaz. Örnek olarak uzun bir kemiğin diafiz kırığı 6 ay boyunca kaynamamış kabul edilmemelidir. Buna karşın femur boyun kırıkları 3 ay sonrasında kaynamamış olarak kabul edilebilir. Kaynamamış bir kırığın en son durumu psödoartroz oluşumu olarak gözlenir. Psödoartrozda kırık uçlarının skleroze olduğu ve yalancı bir eklem oluştuğu görülür (6).

Kaynamama durumlarının gerçek sebepleri bilinmemekle birlikte, hem sistemik hem de lokal faktörlerin etkili olduğu düşünülmektedir.

Sistemik faktörler arasında hastanın metabolik ve nutrisyonel durumu, genel sağlık ve aktivite düzeyi sayılabilir. Sistemik etkiye sahip sigara ve alkolün, kırık iyileşmesi üzerine olumsuz etkisi kanıtlanmıştır (6).

Lokal faktörler arasında, kırığın, açık, segmental, enfekte ve ciddi bir travma sonucu oluşu, yetersiz tespit edilmesi, yetersiz süre immobilize edilmesi, kötü bir açık redüksiyonla tedavisi, plak ve vida kullanılması veya traksiyon uygulanarak fragmanların distrakte edilmesi, radyasyon uygulanması gibi durumlar sayılabilir (6).

2.2.1. Non-union sınıflaması

Kaynamamış kırıklar, kırık uçlarındaki yaşamsal faaliyete göre 2 tipte sınıflandırılırlar (12,13).

I. Hipervasküler (hipertrofik) kaynamamış kırıklar: Biyolojik olarak aktif yaşamsal faaliyet gösteren kırıklardır.

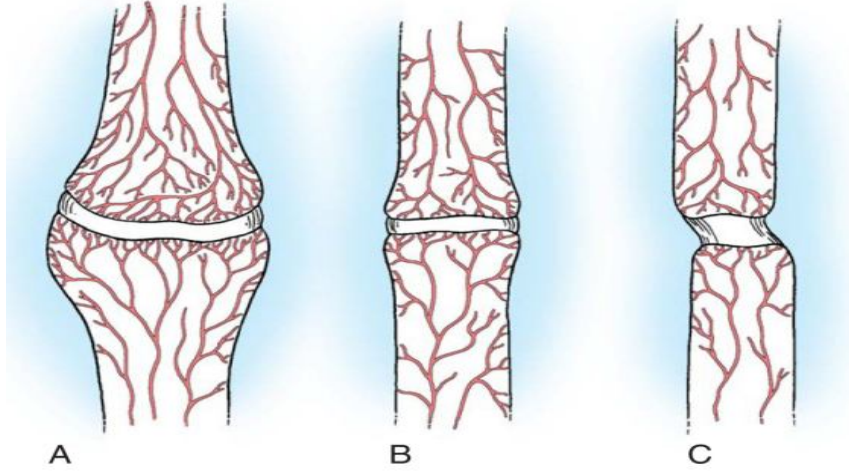
Üç farklı tipte incelenir (Şekil 4):

- Fil ayağı tipinde kaynamamış kırıklar
- At ayağı tipinde kaynamamış kırıklar
- Oligotrofik kaynamamış kırıklar

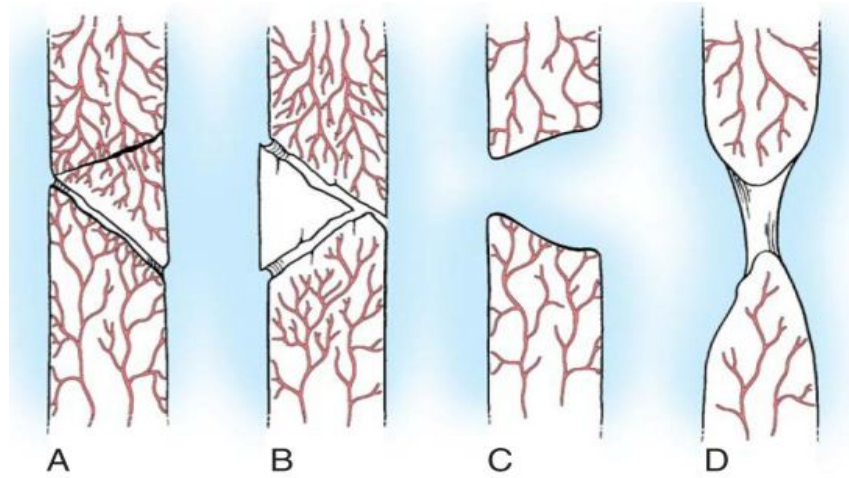
II. Avasküler (atrofik) kaynamamış kırıklar: Biyolojik reaksiyonlara yanıt vermeyen kırıklardır.

Dört farklı tipte incelenir (Şekil 5):

- Torsiyonel kama parça içeren kaynamamış kırıklar
- Parçalanmış kaynamamış kırıklar
- Defektli kaynamamış kırıklar
- Atrofik kaynamamış kırıklar



Şekil 4. Hipervasküler (hipertrofik) kaynamamış kırıklar: **A.** Fil ayağı tipinde kaynamamış kırıklar, **B.** At ayağı tipinde kaynamamış kırıklar, **C.** Oligotrofik kaynamamış kırıklar (13).



Şekil 5. Avasküler (atrofik) kaynamamış kırıklar: **A.** Torsiyonel kama parça içeren kaynamamış kırıklar, **B.** Parçalanmış kaynamamış kırıklar, **C.** Defektli kaynamamış kırıklar, **D.** Atrofik kaynamamış kırıklar (13).

2.2.2. Non-union tedavisi

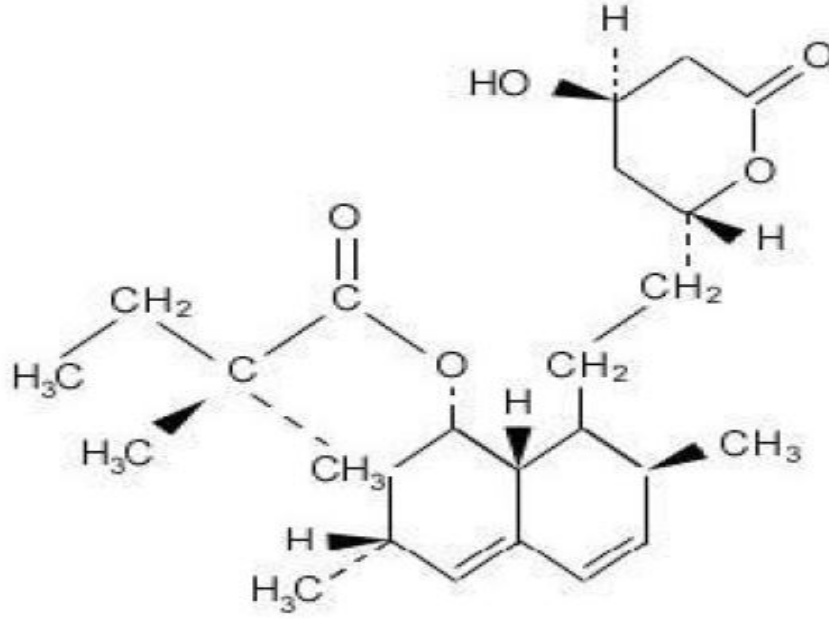
Non-union tedavisi ile ilgili olarak tarihte 1855' te ilk defa yük verme cihazı önerilmiştir. Yine ilk defa 1878' de osteomyelit defekti için kemik grefti kullanmıştır. Vertebral füzyon için 1911' de otojen kemik grefti kullanmıştır. Kaynama yokluğunda 1930-1940 arasında kırık uçlarının tazelenilmesi, kemik grefti ve rijid internal osteosentez prensipleri geliştirilmiştir. Kompresif internal fiksasyon 1940-1950' de önerilmiştir. Kırık bölgesine 1979' da elektrik akımı vermek amacıyla katod yerleştirildiğinde osteogenesisin indüklendiği tespit edilmiştir (14-17).

Yıllar içerisinde klasik non-union tedavisi;

- Kırık uçlarının tazelenilmesi (freshing)
- Kemik grefti uygulanması
- Rijid internal fiksasyon
- Eksternal fiksatörler ile kompresyon-distraksiyon
- Kompresif osteosenteze izin veren internal ve intramedüller tespit yöntemleri olarak şekillenmiştir (6,14).

2.3. STATİNLER

Pek çok farklı sınıftan ilaçlar serum lipitlerini düzenlemektedir. Safra asidi bağlayıcı reçineler (kolestiramin, kolestipol vb.), HMG-CoA redüktaz inhibitörleri (simvastatin, fluvastatin vb.), nikotinik asit (niasin), fibratlar (fenofibrat, klofibrat, gemfibrozil vb.) ve daha yakın zamanda geliştirilen kolesterol absorpsiyon inhibitörleri (ezetimib vb.) bu ilaçlardandır. Serum kolesterol seviyesini düşürmek amacıyla kullanılan ilaçların başında, simvastatin gibi HMG-CoA redüktaz inhibitörü ilaçlar gelmektedir. İnsanda kullanımı uygun görülen ilk statin grubu ilaç Aspergillus terreus'dan izole edilen lovastatindir. Lovastatinin FDA tarafından kabul edilmesinin ardından bu güne kadar 7 statin daha geliştirilmiştir. Bunlardan lovastatin, simvastatin ve pravastatin fungal kaynaklı iken, atorvastatin, fluvastatin, cerivastatin, pitvastatin ve rosuvastatin tamamen sentetik bileşiklerdir (18,19).



Şekil 6. Statinlerin kimyasal yapısı

2.3.1. Statinlerin kimyası ve fonksiyonel özellikleri

Statinlerin kimyasal yapısı;

1. Hedef enzimin substratı olan HMG-CoA analogu kısım,
2. Substrat analogu olan kısma kovalent bağlı olan ve statini enzime bağlama işlevini gören kompleks bir hidrofobik halka yapısı,
3. İlaçların çözünme özelliklerini, dolayısıyla pek çok farmakokinetik özelliklerini belirleyen halka yapılarına bağlı yan gruplar olarak üç kısma ayrılabilir(Şekil 6).

2.3.2. Statinlerin etki mekanizmaları

Statinlerin hipolipidemik etkisi, kolesterol biyosentezinin baskılanmasına bağlıdır. Statinler, kolesterol sentezinde rol alan HMG-CoA redüktaz enzimini kompetitif olarak inhibe eder ve bu nedenle karaciğerde kolesterol sentezini azaltırlar. Ayrıca karaciğerde düşük dansiteli lipoprotein (LDL) reseptör aktivitesini artırarak LDL' nin karaciğerden direkt alımını uyarır ve serumda LDL kolesterol seviyesinin azalmasına yol açar. Statinlerin bir diğer etkisi, LDL öncüllerinin (çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL)) karaciğer tarafından alımını artırarak LDL düzeyini azaltmaktır. Statinlerin trigliserid düzeyi üzerine olan etkisi, VLDL' nin karaciğerde üretiminin azalması ve VLDL kalıntılarının katabolizmasının artması sonucunda

olmaktadır. Sonuç olarak kan trigliserid düzeyini de düşürürler. 250 mg/dl'nin üzerindeki trigliserid seviyeleri statinler tarafından başarılı şekilde düşürülür ve düşme oranı LDL kolesterolde sağlanan düşme yüzdesine benzerdir (20-22).

Statinler, total kolesterolü ve LDL-kolesterolü doza bağımlı bir şekilde düşürmektedirler. Plazma kolesterol düzeylerinde meydana gelen maksimum etki 7-10 gün içinde ortaya çıkmaktadır. Günlük 5 mg atorvastatin, 10 mg simvastatin, 20 mg pravastatin ve 40 mg fluvastatin total kolesterolde ortalama % 22 oranında ve LDL-kolesterolde % 27 oranında azalma sağlar. Statin dozunun 2 katına çıkarılması, total kolesterolde % 5 ve LDL-kolesterolde % 7 ek azalmaya neden olur. Statinler, hipertrigliseridemi olmayan hastalarda yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) kolesterol düzeylerini % 5-10 oranında artırır ve trigliserid düzeylerini % 10-25 oranında azaltır, ama yanıtlar değişkendir. Statinlerin aterojenik lipoproteinleri azaltmalarıyla ilişkili ikincil mekanizmalar ise karaciğerde apolipoprotein B-100 sentezini baskılamaları ve trigliseritten zengin lipoproteinlerin sentez ve salınımlarını azaltmalarıdır (23,24).

2.3.3. Statinlerin pleiotropik etkileri

Bir ilacın amaçlanan etkisi dışında diğer sistemler üzerine olan farklı etkilerine pleiotropik etki adı verilir. Bu etki, ilacın primer ilaç metabolizması ile ilgili olabileceği gibi, tamamen bağımsız da olabilir. Statinlerin pleiotropik etkileri aşağıda ifade edilmiştir.

2.3.3.1. Antioksidan etkisi

Bazı LDL alt grupları insan vücuduna zararlı olan oksidasyona yatkındırlar. Yapılan çalışmalarda, lovastatin ve simvastatinin, LDL oksidasyonunu ve LDL' nin makrofajlar tarafından alınımını inhibe ettikleri gösterilmiştir. Genel olarak veriler, statinlerin plazmadaki antioksidan kapasiteyi artırdıkları yönündedir. Buna ek olarak simvastatin tedavisi alan hiperkolesterolemili hastalarda, sağlıklı insanlara kıyasla antioksidan özelliği olan alfa tokoferolün arttığı saptanmıştır (25,26) .

2.3.3.2. Antiinflamatuvar etkisi

Aterosklerozun erken basamaklarından biri, endotel fonksiyonlarının bozulması sonucu monositlerin endotele yapışması ve subendotelial boşluğa ilerlemesidir. Monositler daha sonra makrofajlara dönüşmekte ve çeşitli proteolitik enzimler ile

büyüme faktörleri salgılamaktadırlar. Deneysel modellerde ve insanlarda yapılan çalışmalarda, ateroskleroz oluşan damarların neointimasında, monosit birikintilerinin varlığı gösterilmiştir. Bunların başlıcaları olan monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) ve nükleer faktör kappa-B (NF-κB)'nin zedelenmiş damar endotelinde aktive olduğu saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda atorvastatinin bu faktörlerin aktivasyonunu inhibe ettiği ve monosit infiltrasyonunu engellediği gösterilmiştir. Yine yapılan çalışmalarda lovastatin ve simvastatinin, hiperkolesterolemisi olan kişilerde monositlerin endotel hücrelerine yapışmalarını engellediği gösterilmiştir (27).

2.3.3.3.Plak stabilitesi üzerine etkisi

Aterosklerozda damar endotelinde oluşan plağın içerdiği kolesterol esterlerinin miktarı, plak stabilitesini etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Statinler, serumdaki LDL kolesterolü azaltarak plak içine giren LDL kolesterolün azalmasına sebep olurlar. Statinlerin, özellikle plakta kolesterol esterlerinin azalması ve birikiminin önlenmesinde etkili oldukları bulunmuştur. LDL oksidasyonunun inhibe olması da endotel içine kolesterol girişini azaltmaktadır. Sonuç olarak plağın kollajen sentezi ve içeriği artmakta ve stabil hale gelmesi sağlanmaktadır (25).

2.3.3.4. Endotel üzerine direkt etkisi

Endotel fonksiyonunun en önemli mediatörü nitrik oksittir (NO). Bu mediatörün salınımında azalma olduğu zaman, trombosit adezyonu artar ve vazokonstriksiyon oluşur. Ayrıca yüzey gerilimi ile lökosit adezyonu artar ve bunların sonucunda da tromboz oluşumu kolaylaşır. Hiperkolesterolemide, endotel disfonksiyonunun nedeni, artmış oksidatif strestir. Bir diğer neden ise hiperkolesterolemi durumunda artan endotel aracılıklı süperoksit radikallerinin NO' i parçalamasıdır. Yapılan bir çalışmada, statin tedavisi alan hiperkolesterolemili hastaların altı ay sonra yapılan kontrollerinde aterosklerotik damarlarda başlangıçta mevcut olan vazokonstriktör yanıtın tedavi ile kaybolduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak statinlerin endotel üzerindeki etkileri vazokonstriksiyonu azaltmaları ve NO' in parçalanmasını engellemeleri olarak ifade edilebilir (28-30).

2.3.3.5. Düz kas hücre çoğalması ve göçü üzerine etkisi

Ateroskleroz oluşumunun en önemli basamağı, lipid depolanması ile birlikte düz kas hücre çoğalması ve göç etmesidir. Yapılan deneylerde statinlerin, hücre migrasyonu ve proliferasyonunu % 70-80 oranında inhibe ettikleri ve bu etkiyi hücre içi sterol sentezini inhibe ederek yaptıkları gösterilmiştir (25).

2.3.3.6. Antiaritmik etkisi

Hangi mekanizma üzerinden etkili olduğu net olarak anlaşılamasa da, yapılmış birçok çalışma, statinlerin, paroksizmal atrial fibrilasyonu ve iskemik kardiyomiyopati zemininde gelişmiş ventriküler taşiaritmilerin tedavisinde etkili olabileceğini gösterilmiştir (25).

2.3.3.7. Kemik doku üzerine etkisi

Yapılan birçok çalışma ile statin grubu ilaçların kemik mineral dansitesini artırdığı, osteoporotik kırık riskini azalttığı ve kırık iyileşmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (2,31). Oral olarak alındığında ilk geçiş etkisine maruz kalan ve bu nedenle kemik üzerine etkisini gösteremeyen statin grubu ilaçlar, kırık bölgesine lokal uygulandığında bone morfojenetik protein-2 (BMP-2) üzerinden osteoblastları artırarak kırık iyileşmesini ve kemik formasyonunu artırdığı bulunmuştur (4,32). Ayrıca yapılan hücre kültür deneyleri ile HMG-CoA redüktaz aktivitesi ve osteoklastik aktivite inhibisyonu arasında ters orantının olduğu gösterilmiştir (33).

2.3.4. Statinlerin yan etkileri

Statinler genellikle iyi tolere edilebilen ilaçlardır. Hepatik transaminazlarda artış genellikle vakaların % 0.5-2.0' sinde ortaya çıkar ve doza bağımlıdır (34). Statinin yan etkileriyle ilgili çalışmalarda klinik olarak önemli transaminaz yüksekliği plasebo grubuyla benzerlik gösterir. Statin kullanımıyla ortaya çıkan transaminaz yüksekliği dozun azaltılması veya aynı dozun devamı ile normale döner. Transaminaz düzeylerinde normal sınırın 3 katı veya daha fazla artışın devam etmesi durumunda ise tedavinin kesilmesi önerilir. Statin kullanımı için kolestaz ve aktif karaciğer hastalığı kontrendikasyon olarak belirlenmiştir. Nadir olmakla beraber statin kullanımıyla oluşan ciddi karaciğer patolojisi de bildirilmiştir (35).

Statinler miyopatiye de neden olabilmektedirler ve bu en önemli yan etkileridir. Bütün statinler miyopati ve rabdomyolizle ilişkili olup, kreatin kinaz (CK)

yükselmesi statine bağılı miyopatinin en iyi göstergesidir. Nonspesifik kas veya eklem ağrıları genellikle CK artışı ile birlikte değildir. Ancak statin grubu ilaç kullanan hastalarda bazen nonspesifik kas ağrısı, hassasiyeti veya güçsüzlüğü ile seyreden ve CK düzeylerinde 10 kattan fazla yükselme ile karakterize miyopati gelişebilmektedir. Bu nedenle statin kullanan hastalarda klinik semptomların hafif seyrettiği durumlarda da CK değerine rutin bakılmalıdır. Şiddetli kas ağrısı, güçsüzlüğü veya kahverengi idrar yapma şikayetleri olan hastalara CK ölçümü yapılmalı ve miyopati saptanırsa statin tedavisi hemen kesilmelidir. Nitekim miyopatinin gözden kaçırılması ve ilaç tedavisinin kesilmemesi rabdomiyoliz, miyoglobüri ve akut tubuler nekroza neden olabilir. Miyopati en sık olarak farklı medikal problemleri olan veya fazla miktarda ilaç alan hastalarda ortaya çıkmaktadır. Miyopati riskini artıran ek bir ilaç kullanılmayan hastalarda, miyopati riski düşüktür (< % 0.1). Yine yaşlı hastalar miyopatiye daha yatkındırlar. Statinlerin, fibratlar veya niasin ile birlikte uygulanması durumunda, muhtemelen iskelet kasında sterol sentezinin aşırı baskılanması sebebiyle miyopati gelişme ihtimali artmaktadır. Ayrıca siklosporin, makrolid grubu antibiyotikler ve antifungal ilaçlarla kombine kullanıldığında da miyopati riski artmaktadır. Çünkü statinlerle bu ilaçlar arasında farmakokinetik etkileşim mevcuttur (21,36).

2.4. OSTEOKALSİN TANIMI

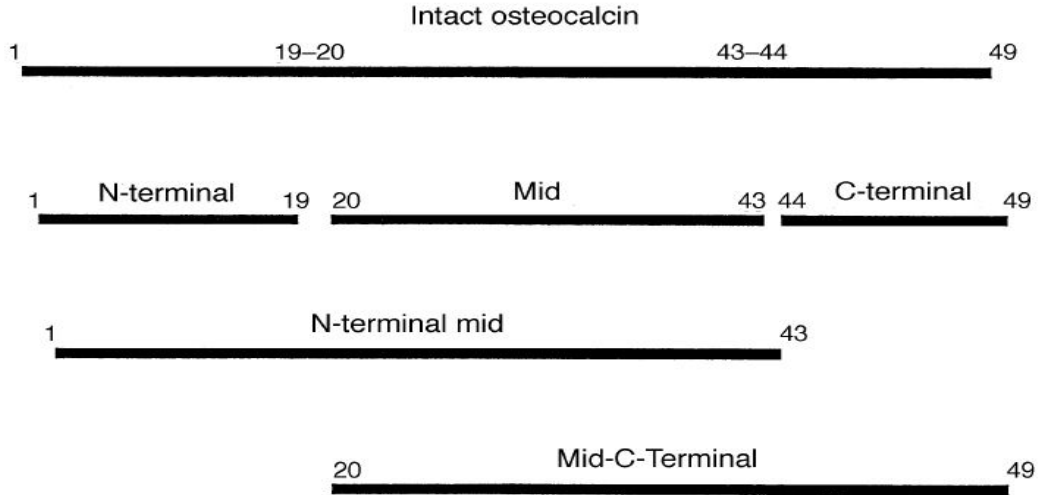
Osteokalsin, 5800 kDa molekül ağırlığında nonkollajen küçük bir proteindir. Osteoblast ve odontoblastların bir ürünüdür. Toplam 49 aminoasitten oluşmuştur ve 1. kromozomda lokalizedir. Kemikte kollajen olmayan proteinin çoğunluğunu oluşturur. Osteokalsinin çoğu, hidroksiapatite bağlanarak kemik matriksinin içine girer. Küçük bir fragman ise dolaşıma salınır. Gençlerde osteokalsinin % 90' ı, erişkinlerde ise % 70' i matrikse bağılı durumdadır (37).

Kemik döngüsünün arttığı durumlarda osteokalsinin serum düzeyi artar. Ayrıca puberte, primer hiperparatiroidi, hipertiroidi, renal osteodistrofi, tedavi edilmemiş osteomalazi, metastatik kemik hastalıklarında ve renal yetmezlikte serum osteokalsin düzeyi artar. Hipoparatiroidi, hipotiroidi, cushing sendromu, multiple myelom ve malign hiperkalsemi gibi glukokortikoidlerle tedavi edilen hastalıklarda ve östrojen kullanımında osteokalsin düzeyi düşer (37).

Osteokalsin ve ALP osteoblastların ürünü olmasına rağmen konsantrasyonları her zaman birbirine paralel değildir. Bunun nedeni, her iki parametrenin osteoblastlardaki değişik metabolizmalara sahip olmaları olabilir (37-39).

Osteokalsinin dolaşımdaki yarı ömrü 5 dakikadır. Serumda osteokalsin düzeyleri diüurnal değişiklik gösterir ve osteokalsin fragmanları da tesbit edilebilir. Osteokalsin düzeyleri gece yükselme, sabahları ise düşme eğilimindedir (40).

Osteokalsin osteoblastlar tarafından sentezlenir. Oluşumu için gerekli olan γ -karboksile glutamik asit (Gla) kalıntısı için Vitamin K' ya ve üretimin uyarılması için de vitamin D3'e gereksinim duyar. Yeni sentezlenen osteokalsin dolaşıma sekrete edilir ve geri kalanı kemik makriksinde tutulur (41,42).



Şekil 7. Osteokalsinin tipleri

İntakt osteokalsinin serum ve plazmada rutin laboratuvar koşulları altında sınırlı stabiliteye sahip olduğu bilinmektedir. Dolaşımda intakt osteokalsin, N-terminal midfragment ve karboksi terminal olmak üzere 3 tip osteokalsin bulunmaktadır (Şekil 7). Serum osteokalsin düzeyleri kalsitriol ve K vitaminine bağlıdır. Osteokalsin, osteoporotik tedavinin izlenmesi ve kemik yapım belirteci olarak sıklıkla kullanılmaktadır (40).

2.5. KEMİK SPESİFİK ALKALEN FOSFATAZ (BAP) TANIMI

ALP, kemikte osteoblastlarda, karaciğerde, barsakta, böbrekte ve plasentada bulunan bir izoenzim ailesidir. Karaciğer fonksiyonları normal olan yetişkinlerde total ALP' nin yaklaşık % 50' si karaciğerden, kalan % 50' si ise kemikten kaynaklanır. Kemik dışı hastalıklarda özellikle karaciğer ve safra bozukluklarında total ALP aktivitesi yükselir (39,43).

ALP aktivitesi çeşitli nedenlerle artabilir. Menopozdan hemen sonraki dönemde kemik döngüsündeki genel artış nedeni ile serum ALP düzeyi normalin iki katına kadar yükselebilir. Aktivitede benzer artışlar; hiperparatiroidi, tirotoksikoz gibi sekonder osteoporozu yol açan hastalıklarda da görülebilir. ALP aktivitesinde artışın bir nedeni de kemik kırıklarına bağlı olarak kemik metabolizmasında meydana gelen lokal artışlardır. Bir hafta içinde yükselip birkaç aya kadar yüksek kalan ve daha sonra düşen ALP değerleri osteomalazi yönünden uyarıcı olmalıdır. Osteoporotik hastalarda serum ALP düzeyi nadiren üst sınırların iki katını aşar.

ALP' nin yarı ömrünün uzun olması nedeniyle çok az diürenal değişimi vardır. Yemekten sonra barsak kökenli ALP aktivitesi arttığından, aç karnına alınan örneklerde ölçüm yapılmalıdır (44).

BAP da ALP izoenzim ailesindedir. BAP aktivitesi en sık kullanılan kemik yapım belirteçidir. Bu enzim osteoblastların membranında lokalizedir ve osteoblastlardan salgılanarak dolaşıma katılır. Serumda BAP aktivitesi kemik mineralizasyonunu ve kemik formasyonunu yansıtmaktadır. Kemik demineralizasyonunda BAP konsantrasyonunun arttığı bilinmektedir. Ayrıca Paget hastalığında primer hiperparatiroidizmde, osteomalazide metastatik karsinomalarda BAP konsantrasyonu artarken, hipotiroidizmde azaldığı gösterilmiştir (44).

2.6. KOLESTEROL TANIMI

Kolesterol, dört halkalı steroid nükleusu ve bir hidroksil grubu olan 27 karbonlu steroldür (Şekil 8). Siklopentan ve perhidrofenantren halkalarından oluşan kolesterol, hücre membranlarının ve plazma lipoproteinlerinin önemli bir bileşenidir. Karaciğer, barsak, adrenal korteks, yumurtalıklar, testisler ve plasentayı kapsayan üreme dokuları vücudun kolesterol havuzuna en büyük katkıyı yapmalarına karşın, kolesterol insanlarda hemen hemen tüm dokular tarafından sentez edilir. Kolesterol,

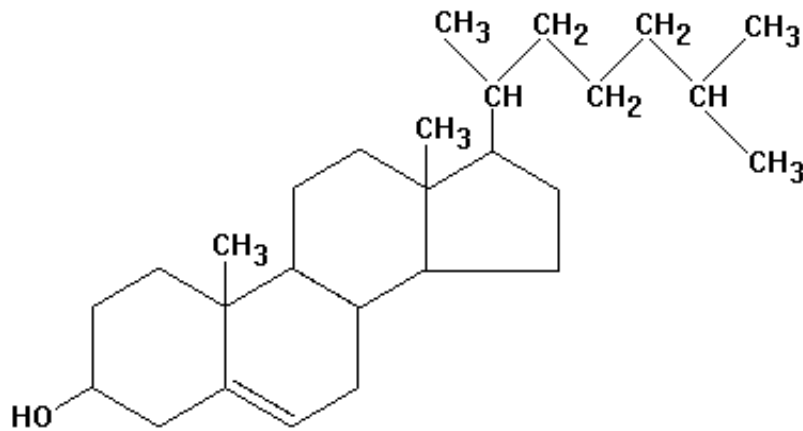
safla tuzları, steroid hormonları ve D vitamininin öncül maddesidir. Karaciğer vücudun kolesterol dengesinin düzenlenmesinde merkezi role sahiptir. Diyetle alınan kolesterol, ekstra hepatik dokularda sentezlenen kolesterol ve karaciğerde de-nova sentezlenen kolesterol, karaciğerin kolesterol havuzunu oluşturur (45,46).

Kolesterol uzun zincirli yağ asitleri gibi asetil CoA' dan sentezlenir. Fakat her 2 yol birbirinden farklıdır. Kolesterol sentezi 4 aşamada gerçekleşir (46,47).

- 1- Üç asetat biriminin kondensasyonu ile 6 karbonlu bir ara bileşik olan mevalonatın oluşumu,
 - 2- Mevalonatın aktive olmuş izopren bileşiğine dönüşümü,
 - 3- Beş karbonlu 6 tane izopren birimlerinin polimerizasyonu sonucu 30 karbonlu lineer bir yapı olan squalenin oluşumu,
 - 4- Son olarak 4 tane squalen yapının halkalaşması yani steroid nükleusun oluşması ve diğer değişikliklerin oluşarak son ürün olan kolesterol oluşumu.
- İlk üç safha hücrenin sitozolünde, son safha ise mikrozomlarda gerçekleşir.

Diyet durumu veya genetik defektler kolesterol metabolizmasını etkiler ve ateroskleroz ve kalp hastalıklarına yol açar. Bu durumda çeşitli ilaçlar ile kolesterol seviyesi düşürülür (47).

Kolesterolün steroid nükleusu insan vücudunda yıkılamaz. Bu nedenle kolesterol safla içine salgılanarak veya safla asitlerine dönüşerek feçes ile atılır (45-47).



Şekil 8. Kolesterolün kimyasal yapısı

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırmalar Merkezi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Patoloji Anabilim Dalı, Radyodiagnostik Anabilim Dalı, Farmakoloji Anabilim Dalı ve Biyokimya Anabilim Dalı imkanları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 08.04.2009 tarih, 09/27 no'lu kararı ile yapılmıştır.

3.1. DENEY HAYVANLARI VE ÇALIŞMA GRUPLARI

Bu çalışmada, Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırmalar Merkezinden temin edilen, 8 haftalık ve ortalama ağırlığı 250 gr (236-275 gr) olan 32 adet Wistar-albino cinsi erkek rat kullanıldı. Deney süresince aydınlık/karanlık ışık döngüsünde normal oda sıcaklığı ve neminde tutulan ratlar, standart pellet yem ve musluk suyu ile beslendi. Ratlar, her grupta 8 denek olacak şekilde 4 gruba ayrıldı.

GRUPLAR:

GRUP K: Kontrol Grubu: Bu gruptaki 16 rat kontrol grubunu oluşturacak şekilde düzenlendi. Kontrol grubu 2' ye ayrıldı.

Grup K4: Bu gruptaki 8 rat ameliyat edildikten sonra non-union gelişmesi için 10 hafta beklendi. Radyografi ile non-union oluştuğu doğrulandı. Non-union sahasına bir hafta süreyle lokal olarak 1 mL/gün serum fizyolojik (SF) uygulandı. Bu gruptaki ratlar SF uygulamasından 4 hafta sonra sakrifiye edildi.

Grup K8: Bu gruptaki 8 rat ameliyat edildikten sonra non-union gelişmesi için 10 hafta beklendi. Radyografi ile non-union oluştuğu doğrulandı. Non-union sahasına bir hafta süreyle lokal olarak 1 mL/gün SF uygulandı. Bu gruptaki ratlar SF uygulamasından 8 hafta sonra sakrifiye edildi.

GRUP S: Simvastatin Grubu: Bu gruptaki 16 rat çalışma grubunu oluşturacak şekilde düzenlendi. Çalışma grubu 2' ye ayrıldı.

Grup S4: Bu gruptaki 8 rat ameliyat edildikten sonra non-union gelişmesi için 10 hafta beklendi. Radyografi ile non-union oluştuğu doğrulandı. Non-union sahasına bir hafta süreyle lokal olarak 10 mg/kg/gün dozunda simvastatin uygulandı. Bu gruptaki ratlar simvastatin uygulamasından 4 hafta sonra sakrifiye edildi.

Grup S8: Bu gruptaki 8 rat ameliyat edildikten sonra non-union gelişmesi için 10 hafta beklendi. Radyografi ile non-union oluştuğu doğrulandı. Non-union sahasına bir hafta süreyle lokal olarak 10 mg/kg/gün dozunda simvastatin uygulandı. Bu gruptaki ratlar simvastatin uygulamasından 8 hafta sonra sakrifiye edildi.

3.2. HAZIRLIK VE AMELİYAT

Denekleri anestezi altına almak için 3 mg/kg ksilazin hidroklorid (Rompun©, Bayer, Türkiye) ve 90 mg/kg ketamin hidroklorid (Ketalar©, Eczacıbaşı, Türkiye) intraperitoneal olarak uygulandı. Deneklerin sağ alt ekstremiteleri kasığa kadar traş edildi ve ameliyat masasına alındı (Şekil 9,10). Operasyon sahası polivinil piroolidon-iyot (Batticon©, Adeka, Samsun, Türkiye) ile dezenfekte edildi ve operasyon sahası açıkta kalacak şekilde steril kompreslerle örtüldü (Şekil 11). Tüm ratlarda sağ uyluk lateral insizyonu kullanıldı (Şekil 12). Cilt-cilt altı doku geçildikten sonra sağ femur 1/3 orta-distal kısımları ortaya konuldu. Periost soyularak mini elektrikli testere (Medtronic, Triton, Microsagittal saw, USA) yardımıyla sağ femurlar middiafizer bölgeden osteotomize edildi. Osteotomi sonrası ratların femurları matkap kullanılarak diz ekleminde retrograd olarak 1,5 mm' lik Kirschner (Kr) telleri ile tespit edildi (Şekil 13). Tespit sonrası Kr tellerinin proksimal ve distalden femur

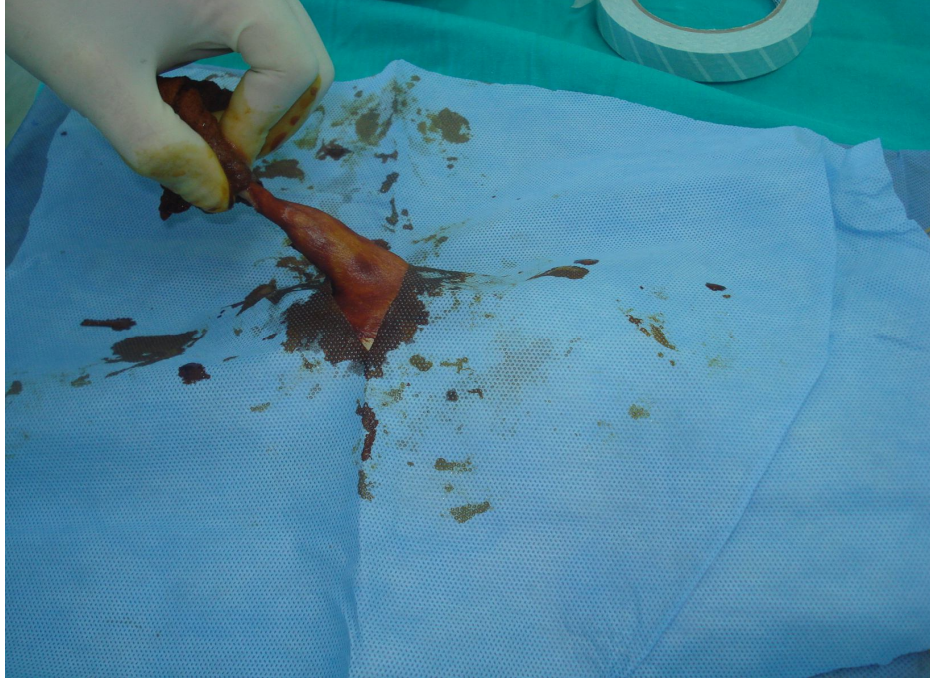
içerisinde kalmasına özen gösterildi. Kr telleri ile tespit işleminden sonra kaynamama durumu oluşturmak için Garcia ve ark. (48)' nin tariflediği gibi osteotomi hattında 1,8 mm gap kalacak şekilde elektronik kumpas ile ölçüldü ve staple çivisiyle tespit yapıldı (Şekil 14,15). Tespit sonrası osteotomi hattı ve insizyon sahası SF ile yıkandı. Yıkama sonrası kas doku ve cilt 3/0 keskin iğneli vicryl (Johnson & Johnson©, Brüksel, Belmddfvc çika) ile usulüne uygun olarak kapatıldı (Şekil 16). Ratlar anestezi sonrası derlenme süresi boyunca ayrı ortamlarda tutuldu ve derlenme sonrasında ameliyat öncesi yerlerine konuldu.



Şekil 9. Deneklerin traş edilmesi.



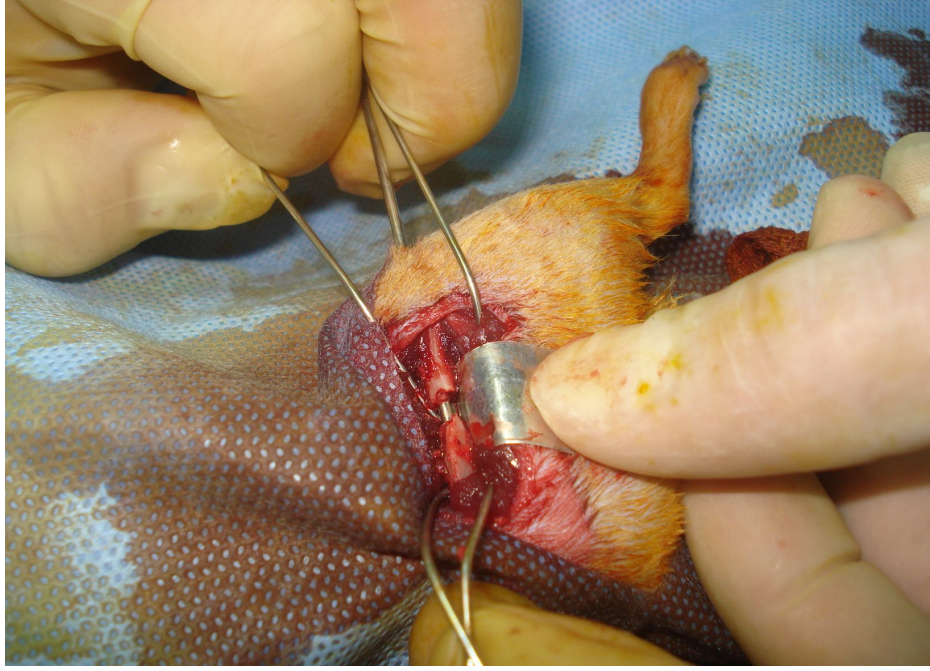
Şekil 10. Deneklerin ameliyat masasına alınışı.



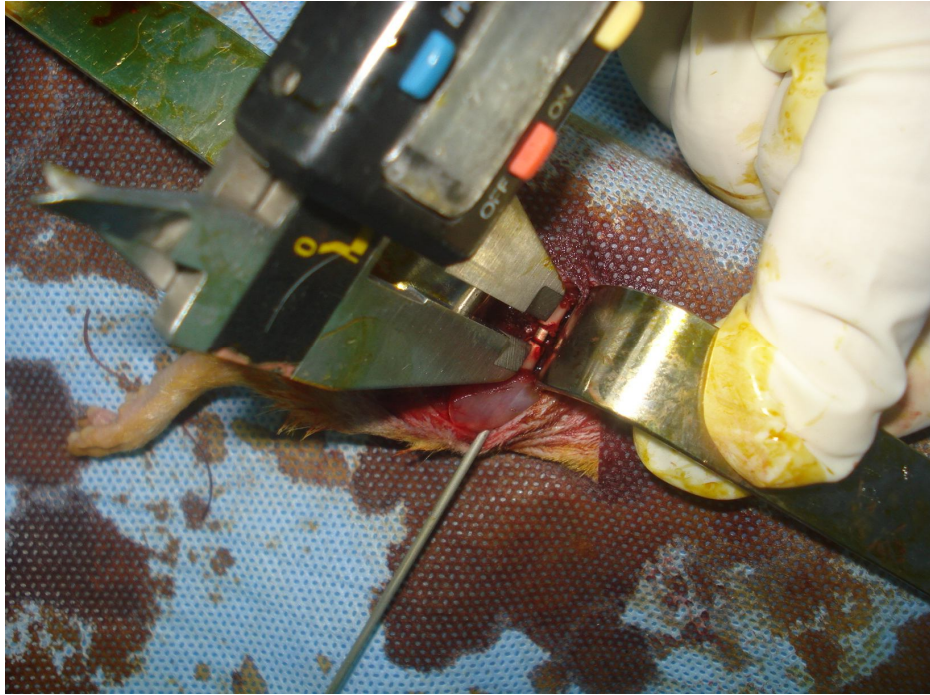
Şekil 11. Deneklerin boyanması ve steril örtülmesi.



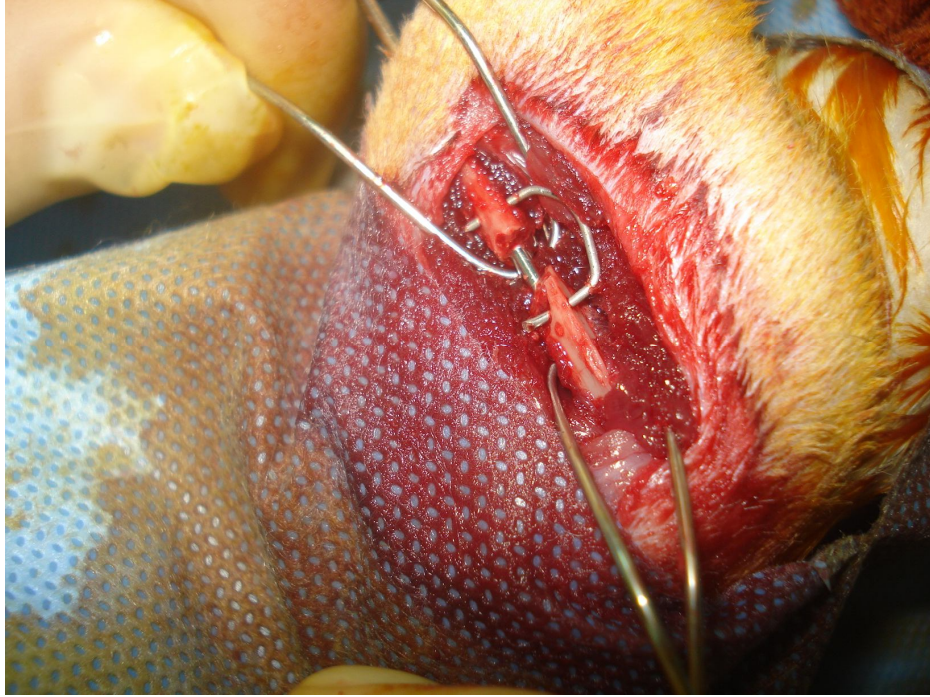
Şekil 12. Cilt insizyonu.



Şekil 13. Kirschner teli ile femurun tespiti.



Şekil 14. Gap aralığının elektronik kumpas ile ölçümü.



Şekil 15. Femurdaki gap korunacak şekilde staple çivisiyle tespit.



Şekil 16. Kasın dikilmesi.

3.3. SİMVASTATİNİN HAZIRLANIŞI VE UYGULANMASI

Simvastatinin sıvı formu olmadığı için lokal kullanım amacıyla Kılıçoğlu ve *ark.* (2)'nin tarif ettiği şekilde sıvı forma dönüştürüldü. Simvastatin 20 mg tablet (Zocor © 20 mg film tablet, Merck Sharp & Dohme, USA) farmakoloji laboratuvarında, biyolojik etkinliği olmayan 10 mL Dimethylsulfoxide (DMSO, 100 mL, % 99,5, D-4540, Sigma, USA) içinde homojen şekilde çözüldü. Çalışma gruplarında osteotomi hattına bir hafta süreyle 10 mg/kg/gün dozunda simvastatin lokal olarak enjektörle uygulandı.

3.4. DENEY HAYVANLARININ SAKRİFİYE EDİLMESİ

Deneklere ketamin-ksilazin anestezisi uygulandıktan sonra radyolojik değerlendirme için sağ femur ön-arka grafileri çekildi. Biyokimyasal çalışma için intrakardiyak 3 mL kan alındıktan sonra intrakardiyak potasyum klorür enjeksiyonu (% 75 KCl®, Galen A.Ş. Türkiye) ile tüm ratlar sakrifiye edildi. Sakrifikasyon sonrası tüm deneklerin sağ femurları % 10 formalin içinde histopatolojik çalışma için ayrıldı.

3.5. RADYOLOJİK DEĞERLENDİRME

Tüm deneklerde ameliyat sonrası 10 hafta beklendi. Non-union gelişimini göstermek amacıyla ketamin-ksilazin anestezisi altında Erciyes Üniversitesi Radyodiagnostik Anabilim Dalı'nda Siemens© Multix C (Japonya) marka röntgen cihazı ile sağ femur ön-arka radyografileri çekildi. Yine tüm ratlara sakrifikasyon öncesi anestezisi altında non-union iyileşmesini değerlendirmek amacıyla sağ femur ön-arka radyografileri çekildi (Şekil 17).



Şekil 17. Deneklere röntgen çekilmesi

Daha sonra çalışma ve kontrol grupları hakkında bilgisi olmayan iki ortopedi ve travmatoloji uzmanı tarafından farklı zamanlarda birbirinden bağımsız olarak ikişer kez değerlendirildi. Değerlendirmede Goldberg sınıflaması kullanıldı (49) (Tablo 1).

Tablo 1. Goldberg Sınıflaması

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

3.6. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

Histopatolojik inceleme için osteotomi sahasını içeren kemik doku örnekleri % 10' luk tamponlanmış nötral formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Kemik doku örnekleri daha sonra asetik asit ve formik asit içeren asit solüsyonunda dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyon sonrasında osteotomi sahasını ortalayacak şekilde kemik parçası kesilerek ayrıldı. Daha sonra bu kemik parçası sagittal düzlemde 2' ye ayrıldı. Elde edilen parçalar giderek artan derecelerde etil alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Ksilolde şeffaflaştırılan dokular son olarak parafin içine

gömülerek bloklandı. Parafin bloklardan alınan 4–6 µm kalınlığında kesitler hemotoksilen eozin (HE) ile boyandıktan sonra Nikon© Optiphot-2 marka ışık mikroskopunda Huo ve ark. (50)' nin tarif ettiği histolojik skorlama sistemi kullanılarak değerlendirildi (Tablo 2). Değerlendirme çalışma ve kontrol grupları hakkında bilgisi olmayan patoloji uzmanı tarafından yapıldı.

Tablo 2. Histolojik skorlama sistemi

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

3.7. BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME

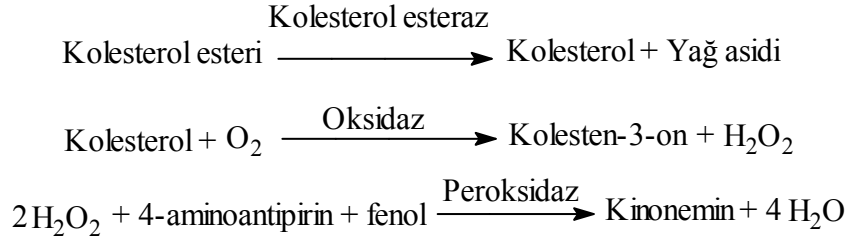
Deneklerden elde edilen numuneler 5000 devirde 5 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Plazmalar derin dondurucuda -70 °C' de saklandı (SANYO© MDF-U73V Osaka, Japonya). Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Biyokimya Laboratuvarı' nda çalışma ve kontrol grupları hakkında bilgisi olmayan biyokimya uzmanı tarafından total kolesterol, osteokalsin ve BAP analizleri yapıldı.

3.7.1. Total kolesterol analizi

Total kolesterol ölçümü, otoanalizörde (Olympus AU-2700, Germany) kolesterol esteraz-oksidadz bileşik enzim yöntemi ile yapıldı.

Prensip: Kolesterol esteraz hidrolizi ile oluşan serbest kolesterol, kolesterol oksidadz enzimi ile kolesten-3-on' a yükseltgenir. Bu reaksiyon sırasında, kolesterol konsantrasyonu ile orantılı olarak oluşan Hidrojen Peroksit (H₂O₂)' in aminoantipirin

varlığında peroksidaz reaksiyonu ile oluşturduğu renkli kinonemin bileşiklerinin absorbansı 520 nm’ de ölçülerek total kolesterol analizi yapılır (Şekil 18).



Şekil 18. Total kolesterol analizi

3.7.2. Osteokalsin analizi

Osteokalsin düzeyleri, IDS marka (Katalog No: AC-12 F1) ELISA kiti ile ölçüldü (Tablo 3).

Prensip:

Metodun prensibi, eşzamanlı olmayan, kompetitif immünokimyasal ölçüm esasına dayanır. Plate kuyucuklarına konulan antikor üzerine, önce işaretli antijen (numune), daha sonra işaretli antijen ardışık olarak eklenir. İşaretli ve işaretli antijen, antikorun bağlanma bölgesi için yarışır. İnkübasyon sonrası reaksiyon ortamına eklenen enzim, antikor-işaretli antijen kompleksine bağlanır. Enzim substratının da ilavesiyle oluşan rengin şiddeti 450 nm’ de okunur.

Reaktifler:

- Primer Antibody: Liyofilize antikor, çalışma tamponu ile çözülerek hazırlandı.
- Osteokalsin Standardı: Liyofilize standart, distile su ile çözülerek, stok standart hazırlandı.
- Biotinylated Peptide: Liyofilize işaretli antijen, çalışma tamponu ile çözülerek hazırlandı.
- Streptavidin-Horseradish Peroxidase (SA-HRP)
- Substrat Solusyonu: 3,3',5,5'-Tetrametil Benzidin Dihidroklorid (TMB) ve H₂O₂ içerir.
- Stop Solusyonu: 0.18 M Sülfirik Asit (H₂SO₄).

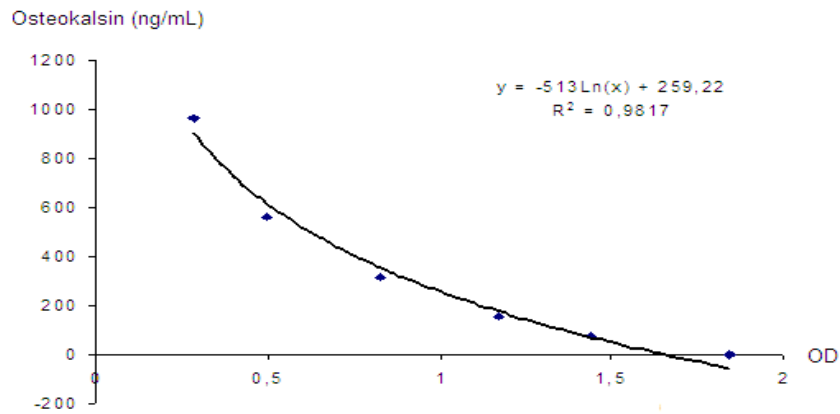
Tablo 3. Osteokalsin analizi

	Kör	Numune
Biotinylated peptide	-	100 µL
Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, her bir kuyucuk 300 µL çalışma tamponu ile 5 kere yıkandı.		
Primer antibody	-	150 µL
Oda sıcaklığında 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, her bir kuyucuk 300 µL çalışma tamponu ile 5 kere yıkandı.		
Sterptavidin-HRP	-	100 µL
Oda sıcaklığında 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, her bir kuyucuk 300 µL çalışma tamponu ile 5 kere yıkandı.		
TMB solusyonu	100 µL	100 µL
Oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dakika inkübe edildi.		
2N HCl solusyonu	100 µL	100 µL

Absorbanslar, 450 nm' de 2 saat içinde okundu.

Standart Grafiği:

Stok osteokalsin çözeltisi, distile su ile uygun oranlarda dilüe edilerek, 0; 76,9; 155; 316,9; 563,8; 965,1 ng/mL konsantrasyonlarında standart seri hazırlandı. Standartlar numune gibi çalışıldı.



Şekil 19. Osteokalsin standart grafiği

Standart konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerleri kullanılarak, osteokalsin standart grafiği çizildi ve hiperbolik bir eğri elde edildi (Şekil 19).

Osteokalsin konsantrasyonlarının logaritmik değerleri kullanılarak, grafik doğrusal hale getirildi.

Hesaplama:

Osteokalsin standart grafiği yardımıyla, numunelerin vermiş olduğu absorbanların konsantrasyonu, bilgisayarda hesaplandı. Osteokalsin seviyeleri, ng/mL olarak verildi.

3.7.3. Kemik spesifik alkalen fosfataz analizi

Kemik spesifik alkalen fosfataz düzeyleri, IDS marka (Katalog No: AC-20F1) ELISA kiti ile ölçüldü (Tablo 4).

Prensip:

Metodun prensibi, immünoenzimatik ölçüm esasına dayanır. Plate kuyucuklarına konulan antikor üzerine, önce işaretsiz antijen (numune), daha sonra işaretili antijen ardışık olarak eklenir. İşaretili ve işaretsiz antijen, antikorum bağlanma bölgesi için yarışır. İnkübasyon sonrası reaksiyon ortamına eklenen enzim, antikor-işaretili antijen kompleksine bağlanır. Enzim substratının da ilavesiyle oluşan rengin şiddeti 405 nm' de okunur. Renk şiddeti, numunede bulunan BAP konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Reaktifler:

- Konjugat: Anti-BAP monoklonal İmmünglobulin G
- BAP Standardı
- Substrat Solusyonu: P-nitrofenilfosfat içerir
- Stop Solusyonu: 1N NaOH

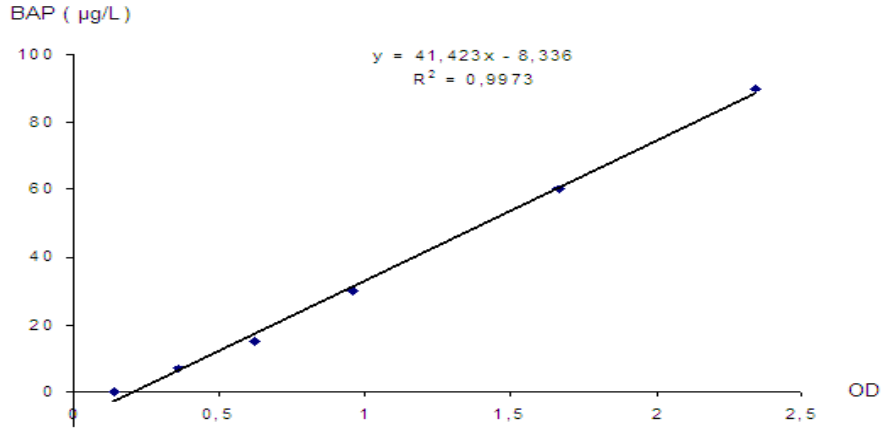
Tablo 4. BAP analizi

	Kör	Numune
Numune	-	50 µL
Konjugat	-	100 µL
Oda sıcaklığında, rotator üzerinde 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, her bir kuyucuk 300 µL çalışma tamponu ile 3 kere yıkandı.		
Substrat solusyonu	-	150 µL
Oda sıcaklığında, rotator üzerinde 15 dakika inkübe edildi.		
1N NaOH	100 µL	100 µL

Absorbanslar, 405 nm’ de 600-650 nm referans köre karşı 1 saat içinde okundu.

Standart Grafiği:

0, 7, 15, 30, 60 ve 90 µg/L konsantrasyonlarında BAP içeren standart seri numune gibi çalışıldı.



Şekil 20. BAP standart grafiği

Standart konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerleri kullanılarak, BAP standart grafiği çizildi (Şekil 20).

Hesaplama:

BAP standart grafiği yardımıyla, numunelerin vermiş olduğu absorbansların konsantrasyonu, bilgisayarda hesaplandı. BAP seviyeleri µg/L olarak verildi.

3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Veriler SPSS (Statistical Package for Social Science) istatistik paket programı (SPSS® for Windows® 17.0) ile değerlendirildi. Nicel verilerin normal dağılıma uygunluğuna Kolmogorov-Smirnov Testi ile bakıldı. Normal dağılıma uyan verilerin istatistikleri $\bar{x} \pm$ standart sapma (ss) olarak tanımlandı. Gruplar arasında anlamlı bir farkın olup olmadığına Tek Yönlü Varyans Analizi ile bakıldı. Varyans analizi sonucu fark çıkan grupların çoklu karşılaştırmalarında Tukey Testi'nden yararlanıldı. Radyolojik, histopatolojik ve biyokimyasal bulgular arasındaki uyum Spearman Korrelasyon Analizi ile değerlendirildi.

Nitel değişkenler için frekans ve yüzde değerler verildi. Nitel değişkenlerin karşılaştırılmasında ki kare (χ^2) testinin exact yöntemi kullanıldı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

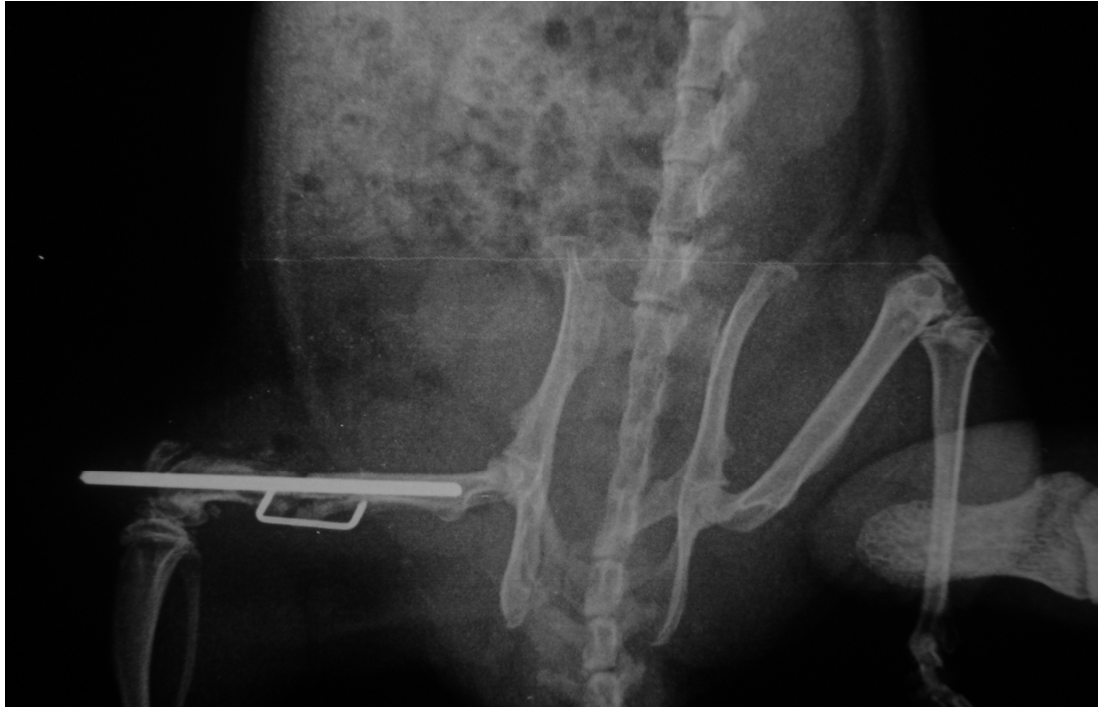
4.1. RADYOLOJİ SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Radyoloji sonuçları karşılaştırıldığında kontrol grupları ile çalışma grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$) (Tablo 5). Tüm grupların kaynama durumlarına göre almış olduğu puanlar (Tablo 1) toplandı. Kontrol grubundan K₄ grubu 2 puan, K₈ grubu 5 puan alırken, S₄ grubu 8 puan ve son olarak S₈ grubunun da 14 puan aldığı görüldü. K₄ grubunda 7 ratta (% 87,5) non-union ve 1 ratta (% 12,5) kaynama görüldü. K₈ grubunda 5 ratta (% 62,5) non-union, bir ratta (% 12,5) muhtemel kaynama bulguları ve 2 ratta (% 25) kaynama görüldü. S₄ grubunda 3 ratta (% 37,5) non-union, 2 ratta (% 25) muhtemel kaynama bulguları ve 3 ratta (% 37,5) tam kaynama görüldü. S₈ grubunda 1 ratta (% 12,5) non-union ve 7 ratta (% 87,5) tam kaynama görüldü.

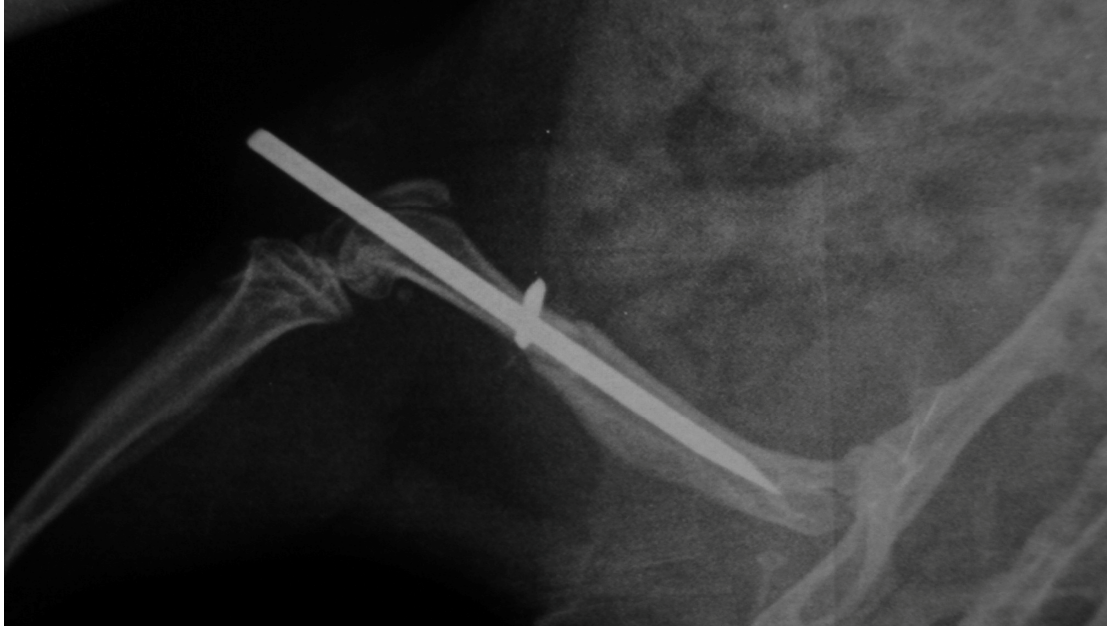
Sonuç olarak radyolojik non-unionun en fazla görüldüğü grup K₄ grubu iken, S₈ grubu da en fazla kaynamanın görüldüğü grup oldu (Şekil 21,22). Ayrıca S₄ ile S₈ grupları karşılaştırıldığında yeterli süre bekleme ile daha iyi kaynama olduğu görüldü.

Tablo 5. Radyoloji istatistik sonuçları

X-RAY	0 puan		1 puan		2 puan		Total		x ²	p
	N	%	n	%	n	%	n	%		
K ₄	7	87,5	0	0,0	1	12,5	8	100	15,051	0,020
K ₈	5	62,5	1	12,5	2	25	8	100		
S ₄	3	37,5	2	25	3	37,5	8	100		
S ₈	1	12,5	0	0,0	7	87,5	8	100		
Toplam	16	50,0	3	9,375	13	40,625	32	100		



Şekil 21. K₄ grubundan bir radyografi.



Şekil 22. S₈ grubundan bir radyografi.

4.2. HİSTOPATOLOJİ SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Histopatolojik inceleme sonuçları değerlendirildiğinde kontrol (K₄, K₈) ve çalışma (S₄,S₈) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$) (Tablo 6).

Tablo 6. Histopatoloji istatistik sonuçları

n: 8	K4 (x ± ss)	K8 (x ± ss)	S4 (x ± ss)	S8 (x ± ss)	P
Puan	2,87 ± 1,12 ^{c,d}	2,75 ± 1,28 ^{c,d}	8,12 ± 1,12 ^{a,b}	8,87 ± 0,83 ^{a,b}	< 0,002

a: 4 haftalık kontrole göre farklı olan grubu gösterir

b: 8 haftalık kontrole göre farklı olan grubu gösterir

c: 4 haftalık simvastatin grubuna göre farklı olan grubu gösterir

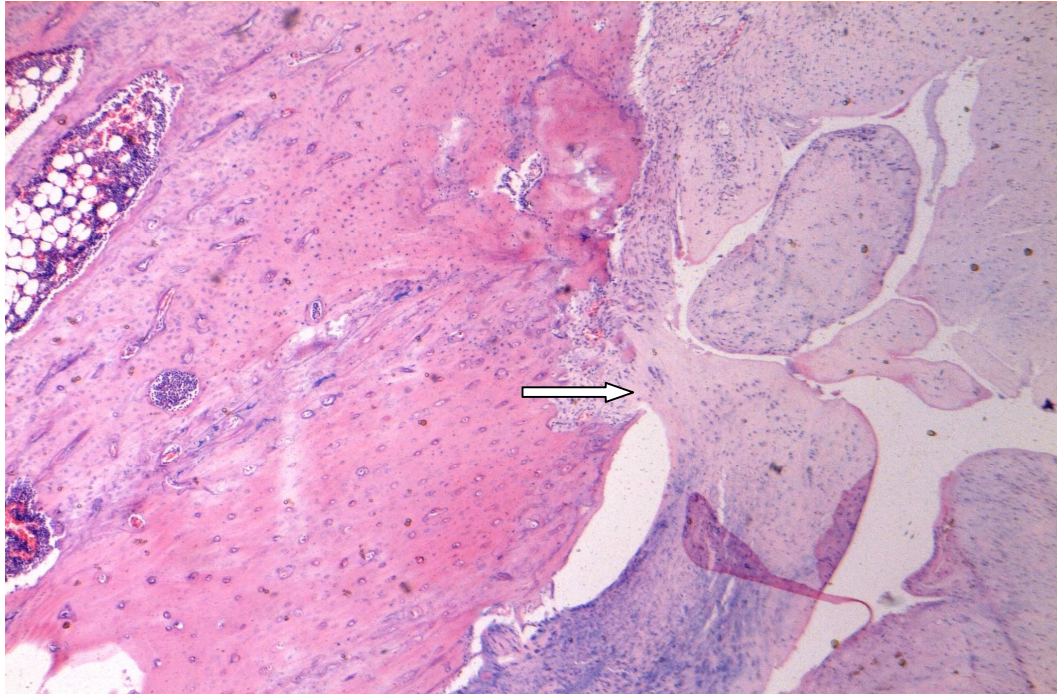
d: 8 haftalık simvastatin grubuna göre farklı olan grubu gösterir

Yapılan mikroskobide K₄ grubundaki 2 ratta geniş alanda fibröz doku, 2 ratta eşit miktarda fibröz ve kıkırdak doku, 3 ratta ağırlıklı olarak kıkırdak doku ve az miktarda fibröz doku ve 1 ratta immatür kemik iyileşmesi görüldü (Şekil 23).

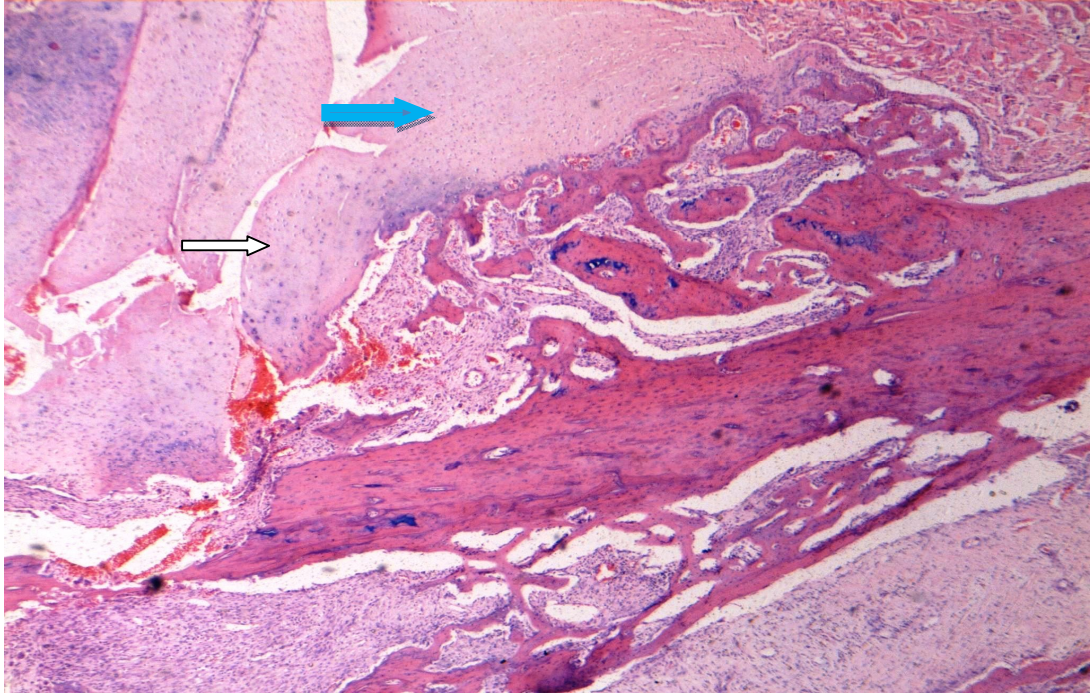
Kontrol grubundan K₈' in yapılan mikroskobik değerlendirilmesinde 1 ratta osteotomi hattında fibröz doku, 2 ratta ağırlıklı olarak kıkırdak doku ve az miktarda fibröz doku, 4 ratta immatür kemik iyileşmesi ve 1 ratta matür kemik iyileşmesi görüldü (Şekil 24).

Simvastatin grubundan S₄' ün yapılan mikroskobik değerlendirilmesinde 2 ratta osteotomi sahasında fibröz doku, 1 ratta eşit miktarda fibröz ve kıkırdak doku, 3 ratta ağırlıklı olarak kıkırdak doku ve az miktarda fibröz doku ve 2 ratta immatür kemik iyileşmesi görüldü (Şekil 25).

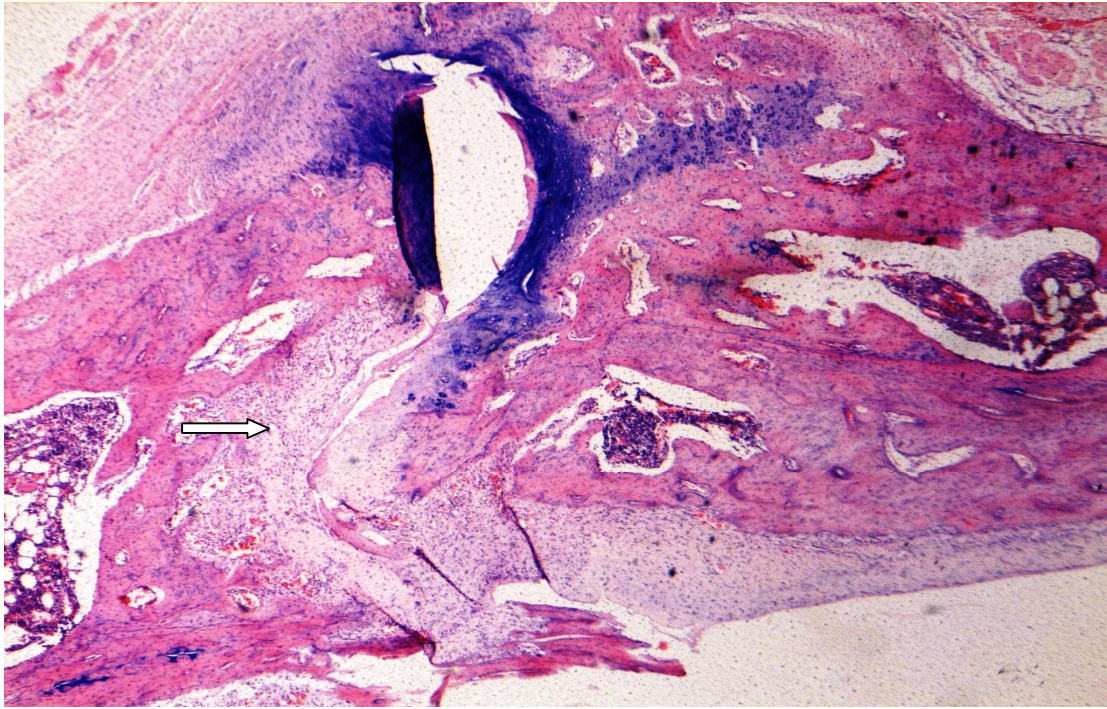
Simvastatin grubundan S₈' in yapılan mikroskobik değerlendirilmesinde 1 ratta osteotomi sahasında fibröz doku, 5 ratta immatür kemik ile iyileşme ve 2 ratta matür kemik ile iyileşme görüldü (Şekil 26).



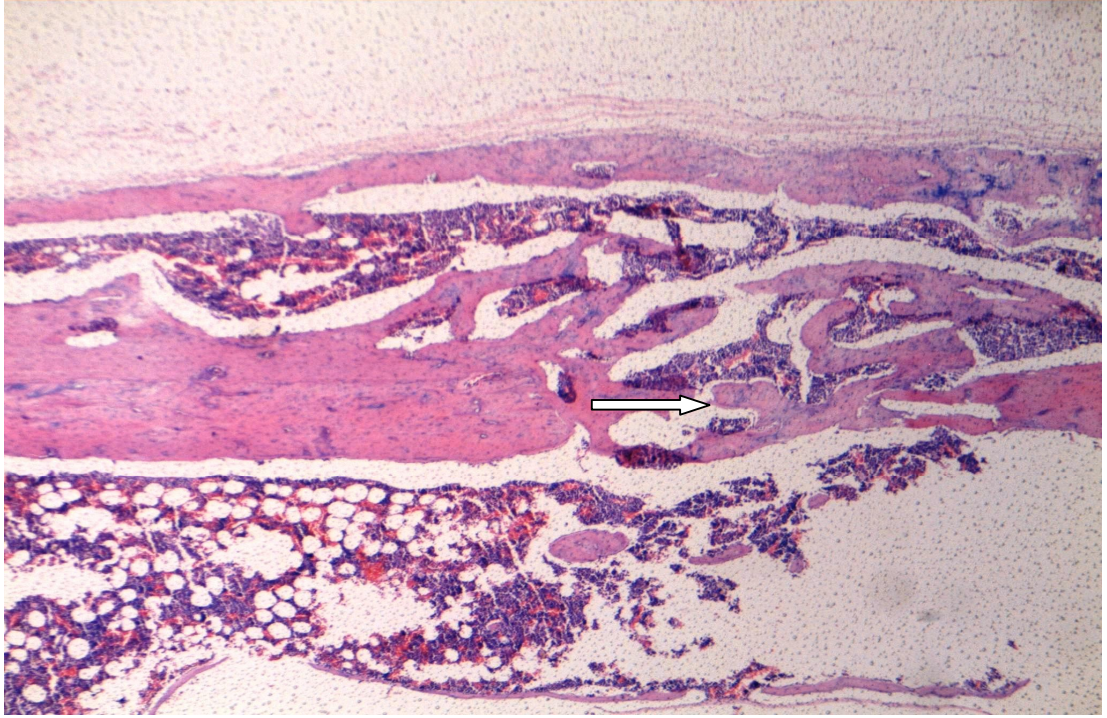
Şekil 23. K₄ grubundan alınan preparatta mikroskobik olarak fibröz dokunun görünümü (ok)(H&E x40).



Şekil 24. K₈ grubundan alınan preparatta az miktarda kıkırdak doku (beyaz ok) ve fibröz doku (mavi ok) görünümü(H&E x40).



Şekil 25. S₄ grubunda alınan preparatta immatür kemik doku görünümü (ok) (H&E x40).



Şekil 26. S₈ grubundan alınan preparatta matür kemik doku ile iyileşme görülmekte (ok) (H&E x40).

Çalışma ve kontrol gruplarının bulguları birlikte değerlendirildiğinde, S₄ ve S₈ gruplarında radyolojik ve histopatolojik bulgular arasında istatistiksel olarak anlamlı, güçlü ve pozitif korrelasyon olduğu görüldü (S₄ grubu için $r = 0,878$, $p < 0,05$ ve S₈ grubu için $r = 0,756$, $p < 0,05$).

4.3. BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİN KARŞILAŞTIRILMASI

4.3.1. Total kolesterol değerlerinin karşılaştırılması

Plazma total kolesterol değerleri karşılaştırıldığında kontrol ve çalışma grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$). Total kolesterol değerleri K₄ ($112,37 \pm 10,86$) ve K₈ ($112,75 \pm 16,01$) grupları ile S₄ ($94,50 \pm 9,91$) ve S₈ ($92,25 \pm 11,88$) grupları arasında karşılaştırıldığında çalışma grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu görüldü. Kontrol ve çalışma gruplarının kendi içlerinde total kolesterol değerlerinde anlamlı fark olmadığı görüldü (Tablo 7).

4.3.2. BAP değerlerinin karşılaştırılması

Plazma BAP değerleri karşılaştırıldığında kontrol ve çalışma grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,05$). Plazma BAP değerleri, K₄ (12,27±0,88) ve K₈ (12,42±2,29) grupları ile S₄ (19,74±1,69) ve S₈ (22,60±1,14) grupları arasında karşılaştırıldığında çalışma grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu görüldü. Ayrıca K₄ ve K₈ grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın olmadığı tespit edilirken, S₈ grubunda S₄ grubuna göre BAP değerinin anlamlı olarak arttığı tespit edildi (Tablo 7).

4.3.3. Osteokalsin değerlerinin karşılaştırılması

Plazma osteokalsin değerleri karşılaştırıldığında kontrol ve çalışma grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,05$). Plazma osteokalsin değerlerinin K₄ (38,69±7,98) ve K₈ (41,77±10,34) gruplarında S₄ (70,22±8,26) ve S₈ (69,07±11,26) gruplarına göre düşük değerlerde kaldığı yani plazma osteokalsin değerlerinin çalışma gruplarında istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunduğu görüldü. K₄ ile K₈ ve S₄ ile S₈ grupları arasında istatistiksel olarak fark olmadığı tespit edildi (Tablo 7).

Tablo 7. Biyokimya istatistik sonuçları

n: 8	K4 (x ± ss)	K8 (x ± ss)	S4 (x ± ss)	S8 (x ± ss)	F	P
Total kolesterol	112,37±10,86 ^{c,d}	112,75±16,01 ^{c,d}	94,50±9,91 ^{a,b}	92,25±11,88 ^{a,b}	6,440	0,002
BAP	12,27±0,88 ^{c,d}	12,42±2,29 ^{c,d}	19,74±1,69 ^{a,b,d}	22,60±1,14 ^{a,b,c}	85,478	<0,001
Osteokalsin	38,69±7,98 ^{c,d}	41,77±10,34 ^{c,d}	70,22±8,26 ^{a,b}	69,07±11,26 ^{a,b}	25,379	<0,001

a: 4 haftalık kontrole göre farklı olan grubu gösterir

b: 8 haftalık kontrole göre farklı olan grubu gösterir

c: 4 haftalık simvastatin grubuna göre farklı olan grubu gösterir

d: 8 haftalık simvastatin grubuna göre farklı olan grubu gösterir

5. TARTIŞMA

Klasik non-union tedavisi, kırık uçlarının tazelenilmesi (freshing), kemik grefti uygulanması, rijid internal fiksasyon, eksternal fiksatörler ile kompresyon-distraksiyon ve kompresif osteosenteze izin veren internal ve intramedüller tespit yöntemleri olarak zaman içerisinde şekillenmiştir (6,14). Non-union tedavisinde, bu tedavi prensiplerine uyulduğu takdirde yüksek oranda tedavi başarısı sağlanabilir. Hipertrofik non-unionda uygun tedavi ile kaynama sağlanırken, atrofik non-unionun tedavisi oldukça zordur ve bu konuda belirgin bir fikir birliği yoktur (48, 51, 52).

Birçok hayvan modeli non-union araştırmaları için kullanılmıştır. Ancak ratların özellikle travma araştırmalarında kullanımının artması, araştırmacıların ratlarla olan daha önceki çalışmalardan deneyimli olması ve son olarak ratlarda kırık oluşturma ve statin uygulama araştırmalarının iyi tarif edilmiş olması gibi nedenlerden dolayı bu çalışmada da rat kullanılmasına karar verilmiştir (32).

Non-union tedavisinin başarılı şekilde yapılabilmesi için öncelikle non-union modeli oluşturmak gerekir. Bu amaçla birçok araştırmacı tarafından sadece non-union oluşturmak için çalışmalar yapılmıştır.

Oetgen ve ark. (53)' nın 48 farede yapılan çalışmasında, 24 farede kapalı standart femur kırığı oluşturulmuş (kontrol grubu) ve geriye kalan 24 fareye de açık osteotomi (çalışma grubu) uygulanmıştır. Çalışma grubunda osteotomi hattının 2 mm distaline ve proksimaline koter uygulayarak periost ortadan kaldırılmıştır. Yapılan histopatolojik değerlendirmede kontrol grubu normal kırık iyileşme bulguları gösterirken, çalışma grubunda gecikmiş iyileşme gözlemlendiği veya hiçbir iyileşme bulgusunun olmadığı tespit edilmiştir. Harrison ve ark.(54)' nın ratlarla yaptıkları çalışmada, mid-diafiziel femoral osteotomi oluşturduktan sonra mini eksternal fiksator ile bir grupta 0,5 mm ve diğer grupta 3 mm gap kalacak şekilde femoral tespit yapılmıştır. Beş hafta sonra yapılan radyolojik değerlendirmede 0,5 mm gap bırakılan grupta kaynama görülürken, 3 mm gap bırakılan grupta non-union olduğu ifade edilmiştir. Dual enerji x-ray absorpsiyometri (DEXA) ile yapılan değerlendirmede 0,5 mm gap bırakılan grupta verilerde artış görülürken, 3 mm gap bırakılan grupta ilk haftalarda artış sonraki haftalarda azalma olduğu görülmüştür. Histolojik çalışmada ise 0.5 mm gap bırakılan grupta 5 hafta sonra kaynama bulguları izlenirken, 3 mm gap bırakılan grupta non-union bulgularının izlendiği rapor edilmiştir. Garcia ve ark. (48)' nın yaptıkları çalışmada, fare femurunda kırık oluşturulmuş ve kırık hattında gap aralığı 0,8 mm ve 1,8 mm olacak şekilde intramedüller çivi ve staple çivisi ile tespit yapılmıştır. Kırık hattı tespit edildikten sonra 10 hafta beklenmiş ve radyolojik olarak non-union gelişimi değerlendirilmiştir. Radyolojik olarak 0,8 mm ve 1,8 mm gap bırakılan ve periosta zarar verilmeyen grupta non-union gelişimi sırasıyla % 33,3 ve % 50 iken, kırık hattında 1,8 mm gap bırakılan ve periostu çıkarılan grupta non-union gelişiminin % 100 olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada Garcia ve ark. (48)' nın tariflediği non-union modeli kullanıldı. Ratların sağ femurlarına osteotomi uygulandıktan sonra proksimalden ve distalden

periost sıyrıldı. Kırık hattı 1,8 mm gap kalacak şekilde tespit edilerek 10 hafta beklendi ve radyolojik olarak kontrol edilerek kaynamama doğrulandı.

Günümüzde yapılan çalışmalara bakıldığında, araştırmacıların kırık iyileşmesini etkileyen pek çok faktör üzerinde durduğu görölmektedir (5,6). Zaman içerisinde çeşitli ilaçlar ve cerrahi teknikler ile kırık iyileşmesinin hızlandırılması amaçlanmıştır. Bunlardan biri de BMP-2 kullanılarak kırık iyileşmesini artırmak ve non-unionda kemik iyileşmesini sağlamaktır. BMP ilk kez 1965’ de Dr Marshall Urist (55) tarafından tanımlanmış olup transforming büyüme faktör beta (TGF-b) ailesinden olduğu bulunmuştur (56). Günümüzde 40 farklı tipi olduğu tespit edilmiştir (57). Bunlardan kemik üzerine etkisi olan BMP-2’ dir (58). İlk başlarda rekombinant teknolojiyle üretilen BMP-2 kırık iyileşmesi üzerine yapılan çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır (59,60). Szpalski ve ark. (59)’ nın insanlarda yapılan çalışmasında, rekombinant teknolojiyle üretilen BMP-2’ nin, akut açık tibia kırıkları ve spinal füzyon hastalarında otojen kemik grefti yerine kullanılabileceği rapor edilmiştir. Govenders ve ark. (60)’ nın 450 hastada yapılan çalışmasında, oluşan açık tibia kırıklarının rekombinant BMP-2 ile tedavisi sonucunda kırık iyileşmesinin arttığı ifade edilmiştir. Sellers ve ark. (61)’ nin tavşanlarda yapılan çalışmasında, rekombinant teknolojiyle üretilen BMP-2’nin kartilaj üzerine olumlu etkilerinin olduğu rapor edilmiştir.

Ancak rekombinant BMP-2 ideal tedavi yöntemi değildir. Çünkü üretimi çok pahalı ve ayrıştırılmasında çok sayıda problem mevcuttur. Sonuç olarak statinler gibi BMP-2’ yi artıran alternatif tedavi yöntemlerine başvurulmuştur (32,62,63).

Mundy ve ark. (4)’ nın ratlarla yapılan çalışmasında, serum kolesterolünü düşüren statin grubu ilaçların BMP-2 genini aktive ederek yeni kemik oluşumunu, osteoblast aktivitesini ve farklılaşmasını artırdığı gösterilmiştir. Ayukawa ve ark. (64)’ nın ratlarla yapılan çalışmasında, simvastatin lokal olarak kemik defektinde kullanılmış ve kontrol grubuna göre daha iyi iyileşmeden bahsedilmiştir. Bu etkiyi BMP-2’ ye ait olan mesajcı ribonükleik asit (mRNA)’ i uyararak yaptığı rapor edilmiştir. Hatano ve ark. (65)’ nın ratların femoral kondillerinden elde edilen kartilaj üzerinde mevastatin ile yapılan çalışmasında, statin grubu ilaçların, BMP-2’ ye bağlı mRNA’ yı uyararak

kırık iyileşmesi ve kartilaj tamirinde etkili oldukları ileri sürülmüştür. Ayrıca aynı çalışmada kondrositlerde tip 2 kollajenin ve proteoglikan sentezinin arttığı da belirtilmiştir. Meier ve ark. (66)' nın 50 yaş ve üstü statin grubu ilaç kullanan insanlarla yaptıkları çalışmada, HMG-CoA redüktaz enzim inhibitörlerinin genel olarak hayvanlarda denendiğini insanlarda da bu çalışmanın yapılabileceği gösterilmiş olup, bu otorlerin çalışmasında, statin grubu ilaçları kullanan 50 yaş ve üstü insanlarda kırık riskinin kullanmayanlara oranla daha düşük olduğu rapor edilmiştir. Wang ve ark. (67)' nın insanlar üzerinde yapılan çalışmasında, statin kullanan yaşlı insanların kalça kırığı oluşma riskinin kullanmayanlara göre daha düşük olduğu ileri sürülmüştür. Edwards ve ark. (68)' nın postmenopozal kadınlarda yapılan araştırmasında, statin grubu ilaçların kemik dansitesini artırdığı ifade edilmiştir.

Statinin kırık riskini azaltma ve kırık iyileşmesi üzerine olumlu etkisinin olduğunu ileri süren çok sayıda araştırmacı varken (69,70), etkisinin olmadığını rapor eden araştırmacılar da mevcuttur (71).

Van staa ve ark. (72) ise, statin grubu ilaçların polikliniklerde reçete edilen dozlarda kırık riskini azaltmasının mümkün olmadığını ifade etmişlerdir. Lacroix ve ark. (73)' nın yapmış oldukları çalışmada, postmenopozal kadınlarda oluşan kırıklarda statin kullanan ile kullanmayan kadınlar arasında iyileşme hızı açısından herhangi bir farkın bulunmadığı ileri sürülmüştür. Ayrıca kemik dansite ölçümlerinin de farklı olmadığı ifade edilmiştir. Yine karşıt görüş belirten başka bir çalışma Von Stechow ve ark. (74)' nın ratlarla yapmış olduğu çalışmadır. Bu otorler, simvastatinin kemik formasyonu üzerine net bir etkisinin olmadığını ileri sürmüşlerdir.

Bu çalışmada statin grubu bir ilaç olan simvastatinin non-union sahasında kırık iyileşmesi üzerine etkili olduğu gösterilmiştir.

Statin grubu ilaçlar, oral yoldan kullanıldığında karaciğerde ilk geçiş etkisine maruz kaldığı için kemiğe olan etkisini ancak yüksek dozlarda veya sürekli infüzyon ile gösterebilmektedir. Yüksek dozda karaciğere ve kas dokuya toksik etki gösterdiği için insanlarda yüksek doz kabul edilemez. Bu sebepten dolayı insanlarda kemik dokuya etki etmesi için lokal olarak uygulanması daha doğru olacaktır (32).

Aspenberg ve *ark.* (75)' nın farelerle yapılan çalışmasında, yüksek doz veya sürekli infüzyon ile simvastatinin kırık iyileşmesini artırdığı gösterilmiştir. Garrett ve *ark.* (32)' nın rat ile yapılmış çalışmasında, statin grubu ilaçların BMP-2 genini stimule ettiği bildirilmiştir. Bu etkisini oral yoldan kullanıldığında ilk geçiş etkisinden dolayı gösteremezken, lokal uygulandığında bu etkiyi gösterebildiği ifade edilmiştir. Bu otörlerin çalışmasında, farklı dozlarda hazırlanan lovastatin ratta oluşturulan kırık hattına ameliyattan hemen sonra lokal olarak uygulanmıştır. Sonuç olarak lovastatinin 20-50 ng/gün dozunda lokal uygulandığında en yüksek kemik yapımının gerçekleştiği ileri sürülmüştür. Gutierrez ve *ark.* (3)' nın ratlarla yapılan çalışmasında, oral ve lokal olarak uygulanan lovastatinin kemik yapımı üzerine etkileri karşılaştırmış ve lovastatinin lokal uygulandığında kemik yapımı üzerine daha etkili olduğu bulunmuştur. Oral yoldan kullanılan lovastatinin lokal uygulanan lovastatin ile aynı etkiyi gösterebilmesi için yaklaşık 1000 katı kadar daha fazla doz uygulanması gerektiği ileri sürülmüştür.

Bu çalışmada da ilk geçiş etkisi göz önüne alınarak simvastatin lokal olarak uygulanmıştır.

Direkt grafi, uygulaması ve değerlendirilmesi kolay olan noninvaziv, basit bir yöntemdir. Kemiğin kaynaması veya kırık iyileşmesinin değerlendirilmesinde belirli bir standart oluşturmak için otörler tarafından skorlama sistemleri geliştirilmiştir. Bunlardan biri de Goldberg radyolojik skorlama sistemidir (Tablo 1). Goldberg ve *ark.* (49)' nın 1985' de kemik grefti uygulaması ve immünite üzerinde yapmış oldukları çalışmada, kaynama ile ilgili olarak radyolojik skorlama sistemi tarif edilmiştir. Garcia ve *ark.* (48)' nın non-union modeli oluşturmak amacıyla farelerde yapılan çalışmasında, radyolojik olarak kırık hattı değerlendirilmiş ve bu değerlendirmede Goldberg ve *ark.* (49)' nın tarif ettiği skorlama sistemini kullanılmıştır. Wang ve *ark.* (31)' nın çalışmasında, tibia kırığı oluşturulan ratlara lokal olarak simvastatin uygulanmış ve radyolojik olarak çalışma grubunda daha fazla kemik yapımının olduğu ifade edilmiştir.

Bu çalışmada birçok otör tarafından kabul gören ve kullanılan Goldberg radyolojik skorlama sistemi kullanıldı. Radyoloji sonuçları değerlendirildiğinde kontrol grupları

ile çalışma grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu, ayrıca S₄ ve S₈ grupları arasında da anlamlı farkın olduğu görüldü.

Yapılan birçok çalışmada araştırmacılar sağlam delillere dayanan histopatolojiyi tek başına kullanmayı yeterli görmüştür.

Wang ve ark. (31)' nin ratlarla yapılan çalışmasında, tibia kırığı oluşturulan ratlara lokal olarak simvastatin uygulanmıştır. Histopatolojik değerlendirmede çalışma grubunda daha iyi kemik yapımının olduğu ifade edilmiştir. Kılıçoğlu ve ark. (2)' nin ratlarla yapmış oldukları çalışmada, kapalı tibia kırığı oluşturmuş ve lokal olarak 2 farklı dozda (1 mg/gün, 2 mg/gün) toplam 5 gün süreyle simvastatin uygulanmıştır. Postop 7, 14 ve 21. günlerde kontrol grubu ve simvastatin grubu histopatolojik olarak değerlendirilmiş ve çalışma grubunda tüm aşamalarda daha iyi kaynama bulgularının olduğu ifade edilmiştir. Ancak dozlar arasında anlamlı fark olmadığı rapor edilmiştir. Ayukawa ve ark. (64)' nin ratlarda simvastatinle yapmış oldukları histopatolojik çalışmada, simvastatinin, osteoklast supresyonu ve osteoblast proliferasyonu yaptığı ileri sürülmüştür. Ameliyat sonrası lokal olarak 3 gün simvastatin uygulandıktan sonra 5. günde değerlendirilmiş ve yeni kemik oluşumunun arttığından bahsedilmiştir. Huo ve ark. (50)' nin 1991' de ratlar ile yapmış oldukları çalışmada, kırık oluşturulduktan sonra oral olarak ibuprofen verilmiştir. Bu otörler tarafından ibuprofenin kırık sahasındaki etkileri mikroskobik olarak incelenerek histopatolojik derecelendirme sistemi oluşturulmuştur. Oetgen ve ark. (53)' nin farede femoral non-union geliştirilmesiyle ilgili histopatolojik çalışmasında, Huo skorlama sistemi kullanılarak kaynamama modeli oluşturulmuştur.

Bu çalışmada Huo ve ark. (50)' nin oluşturduğu histopatolojik derecelendirme sistemi tercih edildi. Kontrol gruplarında ışık mikroskopuyla daha çok fibröz doku az miktarda kartilaj görülürken, simvastatin gruplarında immatür ve matür kemik dokular fazla miktarda görüldü. Böylece subjektif olan radyolojik çalışma daha objektif olan histopatolojik çalışmayla desteklendi. Çalışma ve kontrol gruplarının bulguları birlikte değerlendirildiğinde, S₄ ve S₈ gruplarında radyolojik ve histopatolojik bulgular arasında istatistiksel olarak anlamlı, güçlü ve pozitif korrelasyon olduğu görüldü.

Biyokimyasal parametreler, statin grubu ilaçların kemik dokuya lokal olarak uygulandığında sistemik etki oluşturup oluşturmadığını değerlendirmek amacıyla ve kemik doku üzerine etkisini göstermek amacıyla birçok otör tarafından kullanılmıştır. Wang ve ark. (31)' nin çalışmasında, ratlarda tibia kırığı oluşturulduktan sonra kırık hattına lokal olarak simvastatin uygulanmıştır. Lokal uygulanan simvastatinin sistemik etkisini olup olmadığını göstermek amacıyla serum total kolesterol seviyesine bakılmış ve lokal uygulanan simvastatinin serum total kolesterol seviyesini düşürdüğü bildirilmiştir. Yine bu otörlerin çalışmasında kemik yapım belirteci olan ALP değerlerinin çalışma grubunda anlamlı şekilde yüksek olduğu bildirilmiştir. Kemik yapımını gösteren biyokimyasal parametrelerden birisi de osteokalsindir. Gutierrez ve ark. (3)' nin ratlarda yapmış oldukları çalışmada transdermal lovastatin uygulanmış ve osteokalsinin arttığı işaret edilmiştir.

Rosenson ve ark. (76)' nin insan üzerinde yapmış oldukları yüksek doz simvastatin uygulamasında, biyokimyasal parametrelerden kemik yapımını gösteren BAP ve osteokalsin düzeylerinin artmadığı ifade ederek karşıt görüş bildirilmiştir.

Bu çalışmada da simvastatinin sistemik etki oluşturduğunu görmek amacıyla serum total kolesterol seviyesine bakıldı ve çalışma grubunda düşük bulundu. Diğer biyokimyasal parametreler olan BAP ve osteokalsin verileri değerlendirildiğinde çalışma gruplarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı yükseklik tespit edildi.

Hayvan modelinden elde edilen sonuçların insanlara uyarlanabilmesi çok önemlidir. İnsanlarda kırık iyileşmesinin erken dönemleri incelendiğinde, diyafiz kırıklarında görülen onarım hızı ile deneysel kırığın onarım hızı benzerlikler göstermektedir. Bu nedenle deneysel kırık modelinden elde edilen sonuçların insanlara uyarlanabileceği düşünülmektedir (77).

Yapılan literatür taramasında ratlarda, farelerde ve tavşanlarda çok sayıda non-union modeli tarif edilmiş ve yine çok sayıda kırık iyileşmesinde statin grubu ilaçların etkilerinin incelendiği görülmüştür. Bu çalışmada olduğu gibi kaynamama durumu oluşturulan ve lokal olarak simvastatin uygulanan başka bir çalışma yoktur.

Simvastatin kullanılarak yapılan bu çalışma sonucunda, radyoloji, histopatoloji ve biyokimya sonuçlarına bakıldığında istatistiksel açıdan simvastatinin kaynamama tedavisinde olumlu etki oluşturduğu görüldü.

İlerleyen zamanlarda statin grubu ilaçların osteoporoz, travmaya bağlı kırıklar, geçikmiş kaynama ve kaynamama tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR

Deneysel rat femur non-union modelinde simvastatinin kaynama üzerine etkisi histopatolojik, radyolojik ve biyokimyasal parametreler kullanılarak incelendi ve aşağıdaki sonuçlar elde edildi.

1. Lokal olarak uygulanan simvastatinin, non-union sahasındaki iyileşme üzerine olumlu etkisi tespit edildi.
2. Simvastatinin lokal uygulandıęında sistemik etki oluřturduęu total kolesterol ölçümü ile deęerlendirildi. Total serum kolesterolünü dūřürdüęü görüldü.
3. Simvastatinin BAP ve osteokalsini artırdığı ve dolayısıyla kemik yapımı üzerine olumlu etki yaptığı tespit edildi.
4. Radyolojik değerlendirme skorları karşılaştırıldığında simvastatin verilen gruplarda kontrol gruplarına göre daha iyi kaynama olduğu görüldü.
5. Subjektif olan radyolojik değerlendirme daha objektif olan histopatolojik çalışmayla desteklendi. Histopatoloji sonuçları karşılaştırıldığında kontrol ve çalışma grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi. Ayrıca S4 ve S8 gruplarında radyolojik ve histopatolojik bulgular arasında istatistiksel olarak anlamlı, güçlü ve pozitif korelasyon olduğu görüldü.

6. Sonuç olarak bu çalışma ile simvastatinin non-union tedavisinde etkili olduğu görüldü. Radyolojik ve histopatolojik olarak simvastatin kullanımından 8 hafta sonra iyileşmenin daha iyi olduğu rapor edildi.

7. KAYNAKLAR

1. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. Clin Orthop 1998;355: 7-21.
2. Kılıçoğlu SS, Erdemli E. New addition to the statin's effect. J Trauma 2007;63:187-91.
3. Gutierrez GE, Lalka D, Garrett IR, Rossini G, Mundy GR. Transdermal application of lovastatin to rats causes profound increases in bone formation and plasma concentrations. Osteoporos Int 2006;17:1033-42.
4. Mundy G, Garrett R, Harris S, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. Science 1999;286:1946-9.
5. Turk C, Halıcı M, Guney A, Akgun H, Sahin V, Muhtaroglu S. Promotion of fracture healing by vitamin E in rats. J Int Med Res 2004;32:507-12.
6. Canale TS. Campbell's Operative Orthopaedics (10th ed). Mosby Publishers, Philadelphia 2003.
7. McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. J Bone Joint Surg 1978;60:150-62.
8. Thomas A, Einhorn MD. The science of fracture healing. J Orthop Trauma 2005;19:4-6.
9. Phillips AM. Overview of the fracture healing cascade. Int J Care Injured 2005;36:5-7.
10. Einhorn TA, Hirschman A, Kaplan C, Nashed R, Devlin VJ, Warman J. Neutral protein-degrading enzymes in experimental fracture callus: a preliminary report. J Orthop Res 1989;7:792-805.
11. Cave EF. Delayed Union and Nonunion of Fractures; In Fractures and Other Injuries (1st ed). Year Book Publishers, Chicago 1960.
12. Judet J, Judet R, Lord G. Thermometric study of the areas of fractures and of pseudoarthrosis. Presse Med. 1960;68:39-40.
13. Weber BG, Cech O. Pseudoarthrosis: pathology, biomechanics, therapy, results (2nd ed). Hans Huber, Switzerland 1976.

14. Alonso JE, Repazzino P. The use of the ilizarov concept with the AO/ASIF tubular fixateur in the treatment of segmental defects. *Orthop Clin North Am* 1990;4:655-66.
15. Kuzgun U. Psödoartrozlarda eksternal fiksator ile birlikte direkt akım uygulamaları (1.baskı). Damla matbaacılık, Türkiye 1995.
16. Schwartzman V, Choi SH, Schwartzman R. Tibial Nonunions. *Orthop Clin North Am* 1990;4:639-53.
17. Turan S, Özlü K, Çaygur A, Girgin O. Tibia psödoartrozlarının tedavisinde ilizarov metodu (1. baskı). Damla Matbaacılık, Türkiye 1995.
18. Alberts AW, Chen J, Kuron G, et al. A highly potent competitive inhibitor of hydroxy methylglutaryl coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc Natl Acad Sci* 1980;77: 3957-61.
19. Davidson MH. Rosuvastatin: a highly efficacious statin for the treatment of dyslipidaemia. *Expert Opin Invest Drugs* 2002;11:125–41.
20. Brown MS, Goldstein JL. A receptor – mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986;232: 34-47.
21. Mosca L. Therapy of hyperlipidemia (1st ed). JP Mosby, England 2001.
22. Stein EA, Lane M, Laskarzewski P. Comparison of statins in hypertriglyceridemia. *Am J Cardiol* 1998;81:66-9.
23. Schectman G, Hiatt J. Dose-response characteristics of cholesterol-lowering drug therapies: implications for treatment. *Ann Intern Med* 1996;125:990-1000.
24. Ginsberg HN, Le NA, Short MP, Ramakrishnan R, Desnick RJ. Suppression of apolipoprotein B production during treatment of cholesteryl ester storage disease with lovastatin: implications for the regulation of apolipoprotein B synthesis. *J Clin Invest* 1987;80 1692–7.
25. Koh KK. Effects of statins vascular wall: vasomotor function, inflammation and plaque stability. *Cardiov Research* 2000;47:648-57.
26. Human JA, Ubbink JB, Jerling JJ, Delpoort R, Vermaak WJ, Vorster HH. The effect of Simvastatin on the plasma antioxidant concentrations in patients with hypercholesterolaemia. *Clin Chim Acta* 1997;263:67–77.

27. Ferro D, Parotto S, Basili S, Alessandri C, Violi F. Simvastatin inhibits the monocyte expression of proinflammatory cytokines in patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:427-31.
28. Malhotra HS, Goa KL. Atorvastatin: An update of its pharmacological properties and use in dislipidemia. *Drugs* 2001;61:1835-81.
29. Liao JK. Beyond lipid lowering the rol of statins in cardiovascular protection. *Int Cardiol* 2002;86:5-18.
30. Amerongen GN, Vermeer MA, Aminou PN, Lankelma J, Emeis JJ, Hinsbergh VWM. Simvastatin improves disturbed endothelial barrier function. *Circulation* 2000;102:2803-09.
31. Wang JW, Xu SW, Yang DS, Lv RK. Locally applied simvastatin promotes fracture healing in ovariectomized rat. *Osteoporos Int* 2007;18:1641-50.
32. Garrett IR, Gutierrez GE, Rossini G, et al. Locally delivered lovastatin nanoparticles enhance fracture healing in rats. *J Orthop Res* 2007;25:1351-7.
33. Staal A, Frith JC, French MH, et al. The ability of statins to inhibit bone resorption is directly related to their inhibitory effect on HMG-CoA reductase activity. *J Bone Miner Res* 2003;18:88-96.
34. Miossec P, Zkhir F, Paries J, David Dufilho M, Devynck MA, Valensi PE. Effect of pravastatin on erythrocyte rheological and biochemical properties in poorly controlled Type 2 diabetic patients. *Diabet-Med* 1999;16:424-30.
35. Nakad A, Bataille L, Hamoir V, Sempoux C, Horsmans Y. Atorvastatin induced acute hepatitis with absence of cross toxicity with simvastatin. *Lancet* 1999;353: 1763-4.
36. Christians U, Jacobsen W, Floren LC. Metabolism and drug interactions of 3-hydroxy- 3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in transplant patients: are the statins mechanistically similar? *Pharmacol Ther* 1998;80:1-34.
37. Price CP, Thompson PW. The role of biochemical tests in the screening and monitoring of osteoporosis. *Ann Clin Biochem* 1995;32:244-60.
38. Delmas PD. Biochemical markers of bone remodeling in osteoporosis. *World Congress on Osteoporosis, Netherlands* 1996.
39. Seibel MJ, Robins SP, Blezikian JP. Markers of bone metabolism. In: Becker KL (eds), *Principle and practice of Endocrinology and Metabolism* (2nd ed). Lippincott Company, USA 1995.

40. Alison J, Hodges LS, Eastell R. Measurement of osteocalcin. *Ann Clin Biochem* 2000;37:432-46.
41. Colford J, Sailer D, Langham C. Five osteocalcin assay compared tracer specificity, fragment interference and calibration. *Clin Chem* 1997;43:1240-1.
42. Garnero P, Grimux M, Sequin P, Delmas PD. Characterization of immunoreactive forms of osteocalcin generated in vivo and in vitro. *Bone Miner Res* 1994;92:255-64.
43. Garnero P, Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover. Applications for osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1998;27:303-23.
44. Eastell R. Assessment of Bone Density and Bone Loss. *Osteoporosis Int* 1996; 6:3-5.
45. Burtis CA, Ashwood ER. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry* (4th ed). WB Saunders Company, USA 1996.
46. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry* (3th ed). Worth Publishers, USA 2005.
47. Murray RK, Mayes PA, Granner DK, Rodwell VW. *Harper's Biochemistry* (22th ed). Appleton & Lange Publishers, USA 1990.
48. Garcia P, Holstein JH, Maier S, et al. Development of a reliable non-union model in mice. *J Surg Res* 2008;147:84-91.
49. Goldberg VM, Powell A, Shaffer JW, Zika J, Bos GD, Heiple KG. Bone grafting: role of histocompatibility in transplantation. *J Orthop Res* 1985;3:389-404.
50. Huo MH, Troiano NW, Pelker RR, Gundberg CM, Friedlaender GE. The influence of ibuprofen on fracture repair: biomechanical, biochemical, histologic, and histomorphometric parameters in rats. *J Orthop Res* 1991;9:383-90.
51. Megas P. Classification of non-union. *Injury* 2005;36:30.
52. Hayda RA, Bosse MJ. Moderators' summary: Management of segmental bone defects. *J Am Acad Orthop Surg* 2006;14:142.
53. Oetgen ME, Merrell GA, Troiano NW, Horowitz MC, Kacena MA. Development of a femoral non-union model in the mouse. *Injury* 2008;39:1119-26.

54. Harrison LJ, Cunningham JL, Strömberg L, Goodship AE. Controlled induction of a pseudarthrosis: a study using a rodent model. *J Orthop Trauma* 2003;17:11-21.
55. Urist M. Bone formation by autoinduction. *Science* 1965;12:893-9.
56. Harwood PJ, Giannoudis PV. Application of bone morphogenetic proteins in orthopaedic practice: their efficacy and side effects. *Expert Opin Drug Saf* 2005;4:75-89.
57. Matthews SJE. Biological activity of bone morphogenetic proteins. *Injury Int J Care Injured* 2005;36:34-7.
58. Dinopoulos H, Giannoudis PV. The use of bone morphogenetic proteins (BMPs) in long-bone non-unions. *Current Orthopaedics* 2007;21: 268-79.
59. Szpalski M, Gunzburg R. Recombinant human bone morphogenetic protein-2: a novel osteoinductive alternative to autogenous bone graft? *Acta Orthop Belg* 2005;71:133-48.
60. Govender S, Csimma C, Genant HK, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84:2123-34.
61. Sellers RS, Zhang R, Glasson SS, et al. Repair of articular cartilage defects one year after treatment with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J Bone Joint Surg Am* 2000;82:151-60.
62. Einhorn TA. Clinical applications of recombinant human BMPs: early experience and future development. *JBJS Am* 2003;85:82-8.
63. Polly D, Mafilios M, Ackerman S, et al. An updated cost analysis of BMP in spinal fusion. *Spine J* 2003;3:158.
64. Ayukawa Y, Yasukawa E, Moriyama Y, et al. Local application of statin promotes bone repair through the suppression of osteoclasts and the enhancement of osteoblasts at bone-healing sites in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107:336-42.
65. Hatano H, Maruo A, Bolander ME, Sarkar G. Statin stimulates bone morphogenetic protein-2, aggrecan, and type 2 collagen gene expression and proteoglycan synthesis in rat chondrocytes. *J Orthop Sci* 2003;8:842-8.

66. Meier CR, Schlienger RG, Kraenzlin ME, Schlegel B, Jick H. HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of fractures. *JAMA* 2000;283:3205-10.
67. Wang PS, Solomon DH, Mogun H, Avorn J. HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of hip fractures in elderly patients. *JAMA* 2000;283:3211-6.
68. Edwards CJ, Hart DJ, Spector TD. Oral statins and increased bone-mineral density in postmenopausal women. *Lancet* 2000;355:2218-9.
69. Chan AK, Andrade SE, Boles M, et al. Inhibitors of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and risk of fracture among older women. *Lancet* 2000;355:2185-8.
70. Chung YS, Lee MD, Lee SK, Kim HM, Fitzpatrick LA. HMG-CoA reductase inhibitors increase BMD in type 2 diabetes mellitus patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1137-42.
71. Wada Y, Nakamura Y, Koshiyama H. Lack of positive correlation between statin use and bone mineral density in Japanese subjects with type 2 diabetes. *Arch Intern Med* 2000;160:2865.
72. Van Staa TP, Wegman S, De Vries F, Leufkens B, Cooper C. Use of statins and risk of fractures. *JAMA* 2001;285:1850-5.
73. Lacroix AZ, Cauley JA, Pettinger M, et al. Statin use, clinical fracture, and bone density in postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative Observational Study. *Ann Intern Med* 2003;139:97-104.
74. Von Stechow D, Fish S, Yahalom D, et al. Does simvastatin stimulate bone formation in vivo? *BMC Musculoskelet Disord* 2003;4:8.
75. Skoglund B, Forslund C, Aspenberg P. Simvastatin improves fracture healing in mice. *J Bone Miner Res* 2002;17:2004-8.
76. Rosenson RS, Tangney CC, Langman CB, Parker TS, Levine DM, Gordon BR. Short-term reductoidin bone marker with high dose simvastatin. *Osteoporos Int* 2005; 16:1272-6.
77. Müller ME. *Manuel of internal fixation* (3th ed). Springer-Verlag, Berlin 1991.

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. Atilla KOÇER' e ait “ Deneysel Rat Femur Non-union Modelinde Lokal Uygulanan Simvastatinin Etkileri ” adlı çalışma, jürimiz tarafından Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih :

İmza :

Başkan..... İmza

Üye..... İmza

Üye..... İmza

Üye..... İmza

Üye..... İmza