

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**İNDÜKLENMİŞ MEMBRAN METODUNDA KULLANILAN
ANTİBİYOTİKLİ ÇİMENTO UYGULAMALARININ
MEMBRAN KALİTESİ ÜZERİNE OLAN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Mahircan DEMİR

Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR

2021

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**İNDÜKLENMİŞ MEMBRAN METODUNDA KULLANILAN
ANTİBİYOTİKLİ ÇİMENTO UYGULAMALARININ
MEMBRAN KALİTESİ ÜZERİNE OLAN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Mahircan DEMİR

Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŐMANI

Doç. Dr. Muhammed Cüneyd GÜNAY

ESKİŞEHİR

2021

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Mahircan DEMİR' e ait "İndüklenmiş membran metodunda kullanılan antibiyotikli sement uygulamalarının membran kalitesi üzerine olan etkilerinin araştırılması" adlı çalışma jürimiz tarafından Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih:

Jüri Başkanı Doç. Dr. Muhammed Cüneyd GÜNAY
Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı

Üye Prof. Dr. Akın TURGUT
Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı

Üye Doç. Dr. Mehmet Nuri KONYA
Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun tarih ve/..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. İ.Özkan Alataş
Dekan

TEŞEKKÜR

En baŐta aileme ve niŐanlıma,katkılarından ötürü Doç.Dr.Muhammed Cüneyd Günay'a, değerli arkadaşım Dr. Tugay Avcıya teŐekkürlerimi sunarım.Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na projeye verdikleri desteklerinden ötürü teşekkür ederim.

ÖZET

Demir, M. D. İndüklenmiş Membran Metodunda Kullanılan Antibiyotikli Çimento Uygulamalarının Membran Kalitesi Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir 2021. Geniş kemik defektlerinin tedavisi hekim ve hasta için zorlayıcı ve uzun bir süreçtir. Günümüzde geniş kemik defektlerinin tedavisinde sıkça kullanılan rekonstrüksiyona yardımcı tekniklerinden biri de indüklenmiş membran tekniğidir. Bu teknik kısaca iki basamaktan oluşur. İlk olarak kemikteki defektli alana çimento uygulanmaktadır. Bu aşamadaki amaç, defektif alanın boşluk doldurucu olan çimento ile hem desteklenmesi hem de muhafaza edilmesidir. İlk cerrahi aşamadan 4-6 hafta sonrasında çimento konulan alan etrafında membran meydana gelmektedir. Bu membran vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) salgılamaktadır. İkinci cerrahi aşamada defektif olan kemik bölgesinden çimento çıkarılıp membran yapısı korunarak içerisine hastanın kendisinden alınan kemik grefti konulmaktadır. Tedavi neticesinde bölgede kemik dokusu oluşmakta ve kemik kaynaması sağlanmaktadır. İlk aşamada uygulanan kemik çimentosunun içerisine enfeksiyon varlığına göre antibiyotik katılabilmektedir ancak katılan antibiyotiğin membran üzerine olan histolojik ve mikromoleküler etkileri bilinmemektedir. Bu çalışmanın amacı, kemik çimentosu içerisine antibiyotik katılmasının indüklenmiş membran üzerindeki moleküler ve histolojik etkilerini araştırmaktır. 27 adet Yeni Zelanda cinsi erkek tavşan üzerinde yapmış olduğumuz çalışmada tavşan femurlarında 2 santimetre boyutunda kemik defekti meydana getirildi ve defekt bölgesine antibiyotiksiz, gentamisin ve vankomisin içeren çimentolar konularak 3 grup oluşturuldu. Bu gruplar 6 hafta takip edildi ve 6 haftanın sonunda oluşan membran histolojik olarak incelendi. Yapılan inceleme neticesinde membran kalitesi belirteçlerinin (Von Willebrand faktörü(vwf), İnterlökin 6 (IL), Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta (TGF- β), Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) antibiyotiksiz çimento uygulanan grupta anlamlı biçimde yüksek olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: indüklenmiş membran, osteomyelit, post travmatik, kemik defekti
Destekleyen Kurumlar: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi

ABSTRACT

Demir, M.D. Investigation of the Effects of Antibiotic Cement Applications Used in the Induced Membrane Technique on Membrane Quality. Eskişehir Osmangazi University Faculty of Medicine, Medical Specialty Thesis in Department of Orthopedics and Traumatology, Eskişehir 2021.

Treatment of large segmental bone defects has been a challenging and long process for both physicians and patients. At present, the induced membrane technique is one of the reconstruction techniques commonly utilized in treating large segmental bone defects. It consists of a two-step procedure. In the first one, after bone debridement, the defect is filled with bone cement. The aim at this stage is to support and protect the defective area with cement. A membrane is formed around the area where cement was inserted 4-6 weeks after the first surgical stage. This membrane secretes vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor (FGF), platelet-derived growth factor (PDGF), as shown in the earliest studies. In the second step, the bone cement is removed, and the defect is filled with cancellous bone autograft. In the first stage, antibiotics can be added to the applied bone cement, depending on the infection. Still, the histological and micromolecular effects of the added antibiotic on the membrane are unknown. This study investigates the molecular and histological effects of antibiotics' addition into bone cement on the induced membrane. In this study, conducted on 27 male New Zealand rabbits, the 2 cm long defects of a bone were created in the rabbit femurs. Three groups were formed by placing antibiotic-free, gentamicin, and vancomycin-containing cement in the defect area. These groups were followed for six weeks, and the membrane formed at the end of 6 weeks was examined histologically. As a result of this study, it found that the membrane quality markers (Von Willebrand factor (vwf), Interleukin 6-8 (IL), Transforming growth factor beta (TGF- β), Vascular endothelial growth factor (VEGF) were significantly higher in the antibiotic-free bone cement group.

Key Words: induced membrane, bone defect, osteomyelitis, post traumatic

Supported by: Eskişehir Osmangazi University Scientific Research Project Unit

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|--|------------|
| TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI | <u>iii</u> |
| TEŞEKKÜR | <u>iv</u> |
| ÖZET | <u>v</u> |
| ABSTRACT | <u>vi</u> |
| İÇİNDEKİLER | <u>vii</u> |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | <u>x</u> |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | <u>xi</u> |
| TABLolar DİZİNİ | <u>xii</u> |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 2 |
| 2.1. Kemik İyileşmesi | 2 |
| 2.2. Direkt Kemik İyileşmesi | 2 |
| 2.3 İndirekt Kemik İyileşmesi | 4 |
| 2.4. Akut İnflamatuar Yanıt | 4 |
| 2.5. Mezenkimal Kök Hücreler | 5 |
| 2.6. Kıkırdak Kallus ve Kemik Kallus | 5 |
| 2.7. Revaskülerizasyon ve Neoanjiogenez | 5 |
| 2.8. Kallus Mineralizasyonu-Rezorbsiyonu | 6 |
| 2.9. Açık Kırıklar | 10 |
| 2.10. Tarihçe | 10 |
| 2.11. Etyoloji | 11 |
| 2.12. Açık Kırıkların Sınıflandırılması | 11 |
| 2.13. Epidemiyoloji | 13 |

| | |
|--|----|
| 2.14. Açık Kırıklar ve Kontaminasyon | 16 |
| 2.15. Kemik Defektleri | 17 |
| 2.16. İlizarov Tekniği | 17 |
| 2.17. Vaskülerize Kemik Grefti | 18 |
| 2.18 İndüklenmiş Membran Metodu | 19 |
| 2.18.1 Neden Tercih Edilmeli | 19 |
| 2.18.2. Tekniğin Tarihi | 20 |
| 2.18.3. Tekniğin Açıklaması | 20 |
| 2.18.4. Tekniğin Kullanım Endikasyonları | 21 |
| 2.18.5. İndüklenmiş Membran | 21 |
| 2.18.6 Kemik Çimentosu | 22 |
| 2.18.7. Çimento ve Membran İlişkisi | 23 |
| 2.18.8. İkinci Aşama Uygulama Zamanı | 23 |
| 2.18.9. Kemik Grefti Uygulamaları | 24 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 25 |
| 3.1. Deney Grupları | 25 |
| 3.2. Cerrahi Prosedür | 25 |
| 3.3. Histolojik Gereç ve Yöntem | 30 |
| 3.3.1. Hemotoksilen-Eozin(H-E) Boyama | 30 |
| 3.3.2. Genel Histolojik İnceleme | 30 |
| 3.3.3. İmmunohistokimyasal Boyama | 30 |
| 3.3.4. İmmunohistokimyasal İnceleme | 31 |
| 4. BULGULAR | 32 |
| 4.1. Genel Histolojik Bulgular | 32 |

| | |
|-----------------------------------|----|
| 4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular | 33 |
| 4.2.1. BMP-2 | 33 |
| 4.2.2. VEGF | 33 |
| 4.2.3. VWF | 34 |
| 4.2.4. TGF- β | 34 |
| 4.2.5. IL-6 | 35 |
| 4.2.6. IL-8 | 35 |
| 5. TARTIŞMA | 46 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER | 49 |
| KAYNAKLAR | 50 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|--------------|------------------------------------|
| BMP-2 | Kemik morfojenik proteini-2 |
| DDR-2 | Diskoidin Domain Reseptörü-2 |
| H-E | Hemotoksilen Eozin |
| IL-6 | İnterlökin 6 |
| IL-8 | İnterlökin-8 |
| PMMA | Polimetilmetakrilat |
| TGF- β | Dönüştürücü büyüme faktörü |
| VEGF | Vasküler endotelyal büyüme faktörü |
| VWF | Von willebrand faktör |

ŞEKİLLER

| | Sayfa |
|--|-------|
| 1 Mezenkimal hücre farklılaşması | 7 |
| 2 Osteoklast farklılaşması | 8 |
| 3 Kesici koni mekanizması şematik çizimi | 9 |
| 4 Osteon şematik çizimi | 10 |
| 5 Açık kırıklarda izole edilen mikroorganizmalar | 16 |
| 6 Osteotomize edilmiş tavşan femuru | 27 |
| 7 Defekt bölgesine kemik çimento uygulanması | 28 |
| 8 İndüklenmiş membran oluşumu | 29 |
| 9 Hemotoksilen eozin ile boyama | 38 |
| 10 Hemotoksilen eozin ile boyama | 39 |
| 11 İmmunohistokimyasal boyama VWF | 40 |
| 12 İmmunohistokimyasal boyama VEGF | 41 |
| 13 İmmunohistokimyasal boyama TGF- β | 42 |
| 14 İmmunohistokimyasal boyama BMP-2 | 43 |
| 15 İmmunohistokimyasal boyama IL6 | 44 |
| 16 İmmunohistokimyasal boyama IL8 | 45 |

TABLÖLAR

| | Sayfa |
|--------------------------------|-------|
| 1 Açık kırık sınıflaması | 12 |
| 2 Açık kırıkların dağılımı | 14 |
| 3 Histolojik inceleme skorları | 36 |
| 4 İstatistiksel Veriler | 37 |

1.GİRİŞ

Kemik defektleri ortopedik cerrahide tedavisi zor, maliyetli, uzun soluklu ve hem cerrahı hem de hastayı zorlayan klinik durumlardır. Geniş kemik defektlerinin rekonstrüksiyonu etyolojiye bakılmaksızın ekstremitelerde en büyük sorundur. Yüksek enerjili travmalar, onkolojik durumlarda yapılan rezeksiyonlar, kemik enfeksiyonları, kaynamama gibi klinik durumlar kemik defektlerine sebebiyet verebilmektedir(1). Bunun gibi klinik durumlarda vaskülerize kemik transferi veya İlizarov tekniği kullanılmaktadır. Çoğu otör tarafından 6 cm ve üzerindeki kemik kayıplarında otolog kemik greftlerinde rezorbsiyon gelişeceğinden tek başına kemik grefti uygulaması önerilmez (2).

Kemik kayıplarının rekonstrüksiyonunda kullanılan diğer bir teknik de indüklenmiş membran metodudur. Segmental kemik kayıplarında etkili bir yöntem olan indüklenmiş membran metodu 1986 yılında Masquelet tarafından ortaya konulmuştur (3). İlk zamanlarda kaynamama durumunda uygulanan bu metod günümüzde birçok farklı sebepten kaynaklanan kemik kayıplarında kullanılmaktadır. İndüklenmiş membran metodu iki aşamadan meydana gelmektedir. 1.aşamada kemik defekti olan bölge debride edilir ve her iki kemik ucunun kanlanması sağlanır bu işlemlerin ardından bölgeye kemik çimentosu uygulanır. Uygulanan çimentonun bu bölgede başlıca görevi yabancı cisim reaksiyonu meydana getirmek ve kemik uçları arasındaki boşluğa yumuşak dokunun yerleşmesini engellemektir (4). Kemik çimentosu tek başına yeterli stabilite sağlamamaktadır. Bunun için plak, çivi, eksternal fiksator gibi ortopedik malzemeler ile stabilitenin artırılması gerekmektedir (4). Kemik defektleri çoğunlukla yüksek enerjili travmalar neticesinde oluşan açık kırıklar ile meydana gelmektedir ve beraberinde enfeksiyon tablosu olmaktadır. Birinci aşamada aynı zamanda bu enfektif tablonun da giderilmesi gerekmektedir. Lokal enfektif tablo gerilemeden uygulanan kemik greftleri de enfekte olacağından kaynama elde edilemeyecektir. Enfektif tablonun tedavisi ise debritlemdir. Metodun ilk tanımlanan halinde kemik çimentosu içerisine antibiyotik konulmamıştır çünkü ilk olgular aseptik kaynamalardır ilerleyen zaman içerisinde enfekte olgularda kemik defektlerinin olduğu bölgede tekrar enfeksiyon oluşumunu engellemek

amacıyla antibiyotikli çimentolar kullanılmıştır (4,5).Kullanılan antibiyotikli çimentoların klinik sonuçları hakkında çalışmalar var ise de membran üzerine olan histolojik etkileri net olarak bilinmemektedir(6). Çalışmamızda literatürdeki bu eksikliği gidermek ve kemik çimentosu içerisine antibiyotik katılmasının membran üzerindeki histolojik etkilerini ortaya koymak amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik İyileşmesi

Kemik iyileşmesine dair sahip olduğumuz bilgiler son 30 yıl içerisinde hızlı bir şekilde ilerlemiştir. Kemik dokusu, fibröz doku geliştirmeden iyileşme özelliğine sahip olan çok az sayıdaki birkaç dokudan biridir. İskelet dokusunun rejenerasyon süreci kemik oluşum sürecini taklit ettiğinden fibröz doku gelişimi meydana gelmemektedir. Kemik iyileşme süreci bazen biyolojik yolların bozulması ya da yetersizliği neticesinde sekteye uğrar. Bunun neticesinde iyileşme gecikmesi, pseudo artroz, kaynamama gibi durumlar ortaya çıkmaktadır (7).

Hayvanlar ve insanlar üzerinde yapılan birçok araştırma kemik dokusunun biyolojisini anlamada ve gelişebilecek olumsuzlukları önlemede çok etkili olmuştur. Yapılan hayvan deneyleri kaynama sürecini histolojik, biyokimyasal ve biyomekanik açıdan incelemeye imkân tanımıştır(8).

2.2. Direkt Kemik İyileşmesi

Direkt kemik iyileşmesi, kemiğin anatomik pozisyonda ve mutlak stabilitenin olduğu durumlarda izlenmektedir. İki tipi bulunmaktadır; kontak iyileşme ve gap iyileşmesi (9). Kontak iyileşmede kırık hattındaki kemik uçları arasında 0.01 mm az mesafe ve fragmanlar arasındaki gerimin %2'den az olması gereklidir (7,9). Direkt kemik iyileşmesinde kallus formasyonu gözlenmemektedir. Kontak iyileşmede iyileşme, kesici koniler aracılığıyla olmaktadır(Şekil-3). Kırık meydana geldikten sonra gerekli şartlar varsa

osteoklastlar kırık hattının karşı tarafına yol açmakta ve bunu takip eden osteoblastlar da yeni kemik dokusunu meydana getirmektedir (9). Direkt iyileşmenin ikinci alt tipi olan gap iyileşmesinin oluşması için kemik uçları arasındaki mesafenin 1 mm altında olması gereklidir (7,9). Bu iyileşme türünde kontak iyileşmenin aksine osteonal rekonstrüksiyon gereklidir. Öncelikle kırık uçları arasında kalan boşluk lameller kemik tarafından doldurulur, ardından kesici koni mekanizması devreye girerek osteoklastlar ve osteoblastlar aracılığıyla osteon rekonstrüksiyonu meydana getirilir (7,9)(Şekil-4).

2.3. İndirekt Kemik İyileşmesi

İndirekt iyileşme kemik kaynamasının en sık formudur. Kendi içerisinde endokondral ve intramembranöz şeklinde ikiye ayrılmaktadır. Bu kaynama türünde anatomik redüksiyon ve rijit fiksasyon koşulları gerekmemektedir. Mikro hareket ve kemiğe yük binmesiyle indirekt iyileşme hızlanabilmektedir. İndirekt iyileşme çoğunlukla konservatif tedavi yaklaşımlarında gördüğümüz bir iyileşme şeklidir ancak eksternal fiksatör, intramedüller çivi, parçalı kırıklarda uygulanan köprü plaklama gibi cerrahi prosedürlerde de izlenebilmektedir (7).

2.4. Akut İnflamatuar Yanıt

Kemik kırıklarından sonra kırık olan bölgede hematoma meydana gelmektedir, bu hematoma periferik damarlar ve kemik damarlarından kaynaklanmaktadır. Ayrıca kemik iliğinden gelen hücreleri de içermektedir. Kırık uçlarının etrafında oluşan bu hematoma bir süre sonra kallus adı verilen kırık uçları arasında köprü vazifesi gören bir yapıya dönüşür. Kemiğin kaynama süreci kallus adı verilen bu yapı içerisinde olmaktadır. Hematom, kallus, kemik şeklinde giden iyileşme döngüsü bölgeye gelen inflammatuar sitokinlerin etkisiyle başlamaktadır; bu sitokinlerin kısa ve düzenli salınımı kemik iyileşmesi için esansiyel bir durumdur (7,10).

Kırık meydana geldikten sonra bölgeye gelen makrofaj, trombosit, nötrofil ve diğer inflammatuar hücrelerden salınan tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α), interlökin 1-6-11-18 adlı sitokinler inflamasyon, farklılaşma ve yeni damar oluşum sürecini başlatır (7,8). TNF-a bu süreçte rol alan en önemli sitokinlerden biridir, mezenkimal hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşma sürecini başlatarak yeni kemik oluşumunu sağlamaktadır. Salınan interlökinler arasında 1 ve 6 önemli interlökinler olarak kabul edilmektedir. TNF-a ile koordineli olarak salınmakta ve mezenkimal hücrelerin osteoblastlara dönüşümünde akut fazda önemli rol oynamaktadırlar(10,11).

2.5. Mezenkimal Kök Hücreler

Kemik yenilenmesi için spesifik mezenkimal kök hücrelerin ortamda bulunması gerekmektedir. Bu hücreler farklı hücre tiplerine dönüşerek dokuda meydana gelen hasarın onarımında rol almaktadırlar (Şekil-1). Mezenkimal kök hücreler kemik medullasından kaynaklanmaktadır. Bu hücreler bölgeye gelen inflamatuvar hücrelerden salınan sitokinler ile kemik oluşumunda görevli olan osteoblast ve osteoklastlara dönüşmektedir ve bu aşama iyileşme sürecinde en önemli basamaktır (12).

2.6. Kıkırdak Kallus ve Kemik Kallus

Kırık meydana geldikten sonra 3. ve 14. günler arasında yumuşak kallus ya da kıkırdak kallus adı verilen yapı oluşmaktadır. Kırık bölgesine gelen hücrelerden salınan trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β) adlı sitokinler, mezenkimal hücreleri uyarak bu hücrelerin kondrositlere dönüşümünü sağlarlar. Oluşan kondrositler kollojen sentezler ve kıkırdak kallus adı verilen yapı meydana gelir. Kıkırdak kallus ilerleyen dönemde (14.-28. Günler) osteoblastlar aracılığıyla mineralize olarak yerini kemik kallusa bırakmaktadır. Oluşan kallus formasyonu kırık bölgesinde stabilite sağlamaktadır (7).

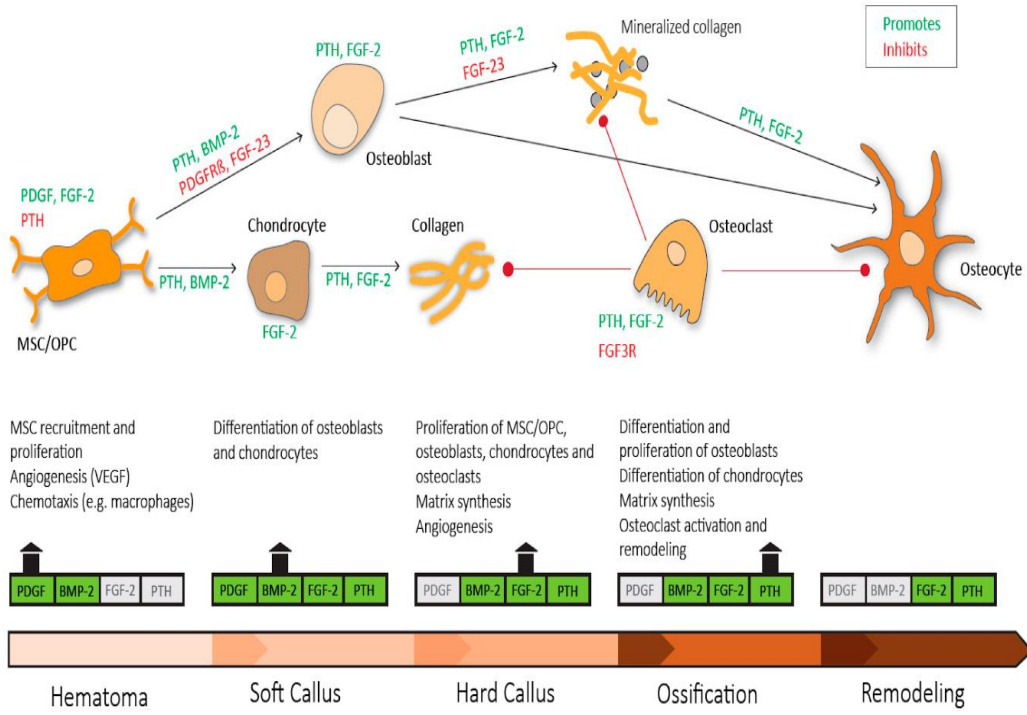
2.7. Revaskülerizasyon ve Neoanjiogenez

Kırık bölgesinde kaynama meydana gelmesi için kan akımı ve yeni damar oluşumu çok önemlidir. Kırık bölgesinde damarlanma iki major molekül aracılığıyla düzenlenmektedir; bunlar anjiopoetin ve vasküler endotelial büyüme faktörüdür (VEGF)(7). Anjiopoetin iki adet alt molekülü bulunmaktadır, anjiopoetin 1 ve 2 adı verilen bu moleküller periostal damarlanmada majör role sahiptir. VEGF molekülü damarlanmada daha önemli bir rol oynamaktadır. Osteoblast, hipertrofik kondrositler ve damar endotelinden salınan bu molekül damarsız kıkırdak dokunun damarlı kemik

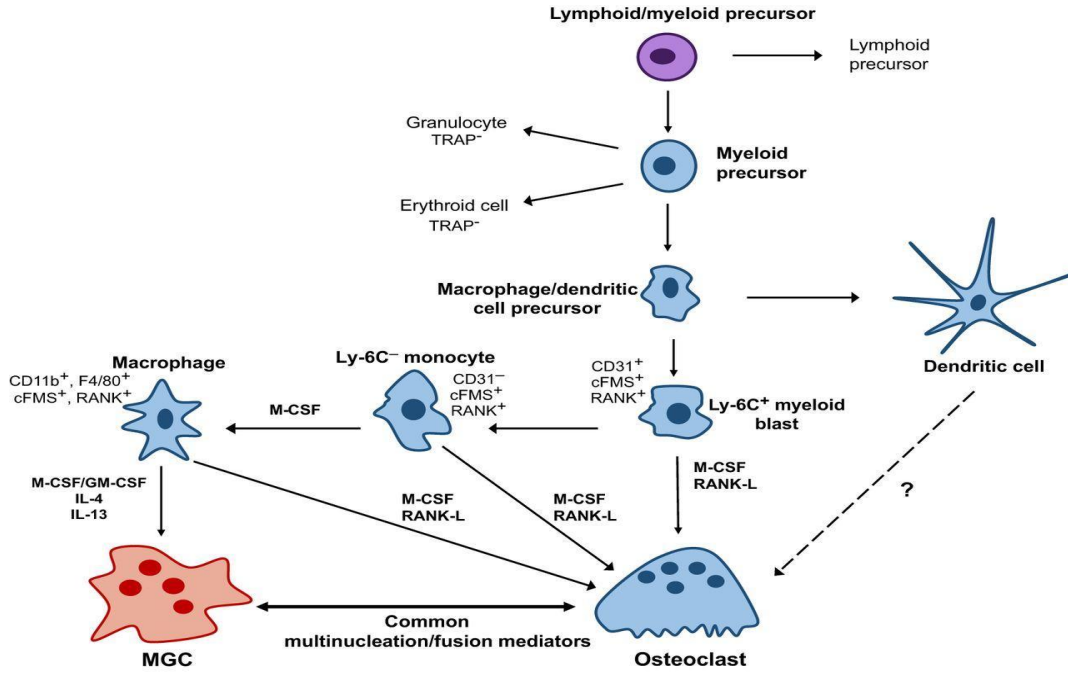
dokuya dönüşümünü sağlamaktadır. Hayvanlarda yapılan deneylerde VEGF reseptörünün bloklanması neticesinde kırık iyileşmesinin geciktiği gösterilmiştir (7).

2.8. Kallus Mineralizasyonu-Rezorbsiyonu

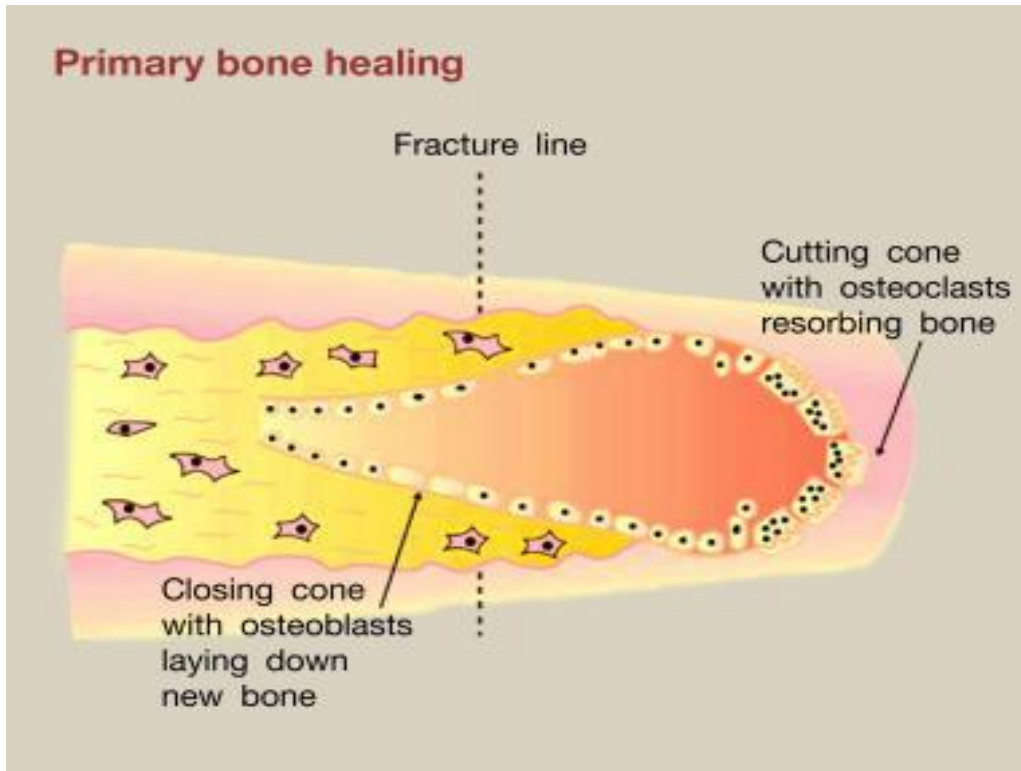
Kemiğin rejenerasyon sürecinde yumuşak kallusun yerini sert kallusa bırakmasının ardından bu mineralize dokunun yeniden şekillendirilmesi gerekmektedir. Mineralize dokunun rezorbsiyonu osteoblast ve osteoklast hücreleri aracılığıyla meydana gelmektedir. Osteoklast adı verilen bu hücreler hematopoetik kök hücrelerinden kaynaklanmaktadır ve aktiviteleri başlıca makrofajlardan salınan makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF) ve osteoblastlardan salgılanan RANK-L molekülü ile sağlanmaktadır(Şekil-2). Osteoklastlar salgılamış oldukları katepsin ve matriks metalloproteinaz gibi hidrolitik enzimlerle kemik rezorbsiyonunu gerçekleştirmektedir. Bu rezorbsiyon sürecinin insan ve hayvan modellerinde 3-4 haftada başladığı gösterilmiştir (7).



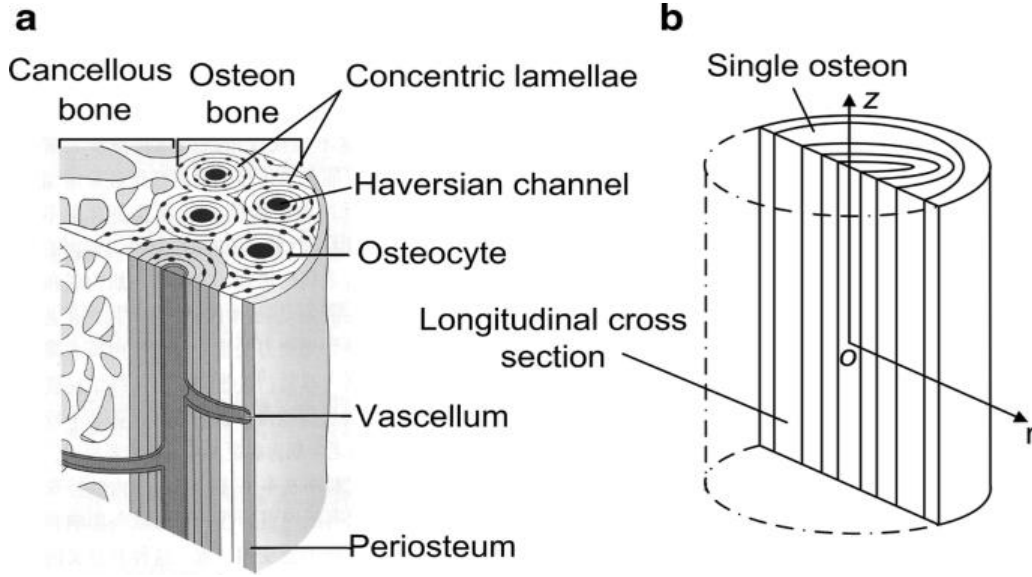
Şekil-1 - Üstteki şekilde mezenkimal kök hücrelerin farklılaşması, mineralizasyon süreci ve aracı moleküller görülmektedir(12).



Şekil-2 - Üstteki şekilde osteoklast hücrelerinin farklılaşması, oluşum süreci ve aktivitelerini düzenleyici aracı moleküller görülmektedir(13).



Şekil-3 - Üstteki şekilde kesici direk kemik iyileşmesinde görevli kesici koni mekanizması görülmektedir(14).



Şekil-4 - Üstteki şekilde kemikte osteon yapısı görülmektedir (15).

2.9. Açık Kırıklar

Açık kırık terimi kemik ile dış ortam arasında temas olmasını anlatan bir durumdur. Yaralanmanın lokalizasyonuna, kemik defektine ve yaranın genişliğine bağlı olarak farklı tedavileri barındıran klinik bir süreçtir(16).

2.10. Tarihçe

Günümüze kadar açık kırıklara farklı şekillerde yaklaşılmıştır. Yüz yıl kadar önce açık kırık sonucu meydana gelen ölümleri engelleyebilmek amacıyla amputasyon uygulaması yapılıyordu. 1939 yılında ilk kez Trueta tarafından açık kırıkların kapalı olarak tedavi edilmesi fikri ortaya atılmıştır (17). İlerleyen dönemde antibiyotiklerin

geliştirilmesiyle ve seri debritleme uygulamalarıyla birlikte açık kırıklardan sonra oluşan enfeksiyon ve ölüm oranları ciddi bir şekilde düşmüştür (18).

2.11. Etiyoloji

Açık kırıklar genel olarak kapalı kırıklardan daha şiddetli bir travma neticesinde ortaya çıkmaktadırlar (19). Ancak düşük enerjili torsiyonel kırıklar neticesinde de cildin ince olduğu bölgelerde açık kırıklar meydana gelebilmektedir. Genç yaş grubunda trafik kazaları ön plandadır. Bunun dışında iş kazaları, intihar girişimleri, ateşli silah yaralanmaları, spor yaralanmaları ve düşmeler etiyojide yer alan diğer sebeplerdir(19).

2.12. Açık Kırıklarda Sınıflandırma

Açık kırıklarda sınıflandırmanın amacı benzer yaralanmalarda tedavi yöntemlerinin doğru olarak tarif edilebilmesi ve kıyaslanabilmesidir. Açık kırıkları sınıflandırmak amacıyla 1958 de Ellis (20) ve 1965'te Cauchoix (21) tarafından çeşitli sınıflamalar yapılmıştır. Ancak günümüzde 1984 yılında Gustilo ve Anderson tarafından geliştirilen cilt ve yumuşak doku yaralanmasının ciddiyetine göre kırık tipini 3'e ayıran sınıflama sistemi kullanılmaktadır (22).

Tablo-1 - Açık kırık sınıflandırması (23)

| GUSTİLO ANDERSON SINIFLAMASI | TANIM |
|------------------------------|--|
| TİP 1 | YARA BÜYÜKLÜĞÜ 1 CM DEN UFAK OLAN AÇIK KIRIKLAR |
| TİP 2 | YARA BÜYÜKLÜĞÜ 1 CM DEN BÜYÜK OLAN AÇIK KIRIKLAR |
| TİP 3 | YARA BÜYÜKLÜĞÜ 10 CM DEN BÜYÜK OLAN AÇIK KIRIKLAR |
| TİP 3-A | KEMİK İÇİN YETERLİ YUMUŞAK DOKU ÖRTÜSÜ VAR |
| TİP 3-B | KEMİK İÇİN YETERLİ YUMUŞAK DOKU ÖRTÜNMESİ YOK PERİOSTAL SIYRILMA MEVCUT |
| TİP 3-C | TEDAVİ GEREKTİREN DAMAR HASARI MEVCUT |

2.13. Epidemiyoloji

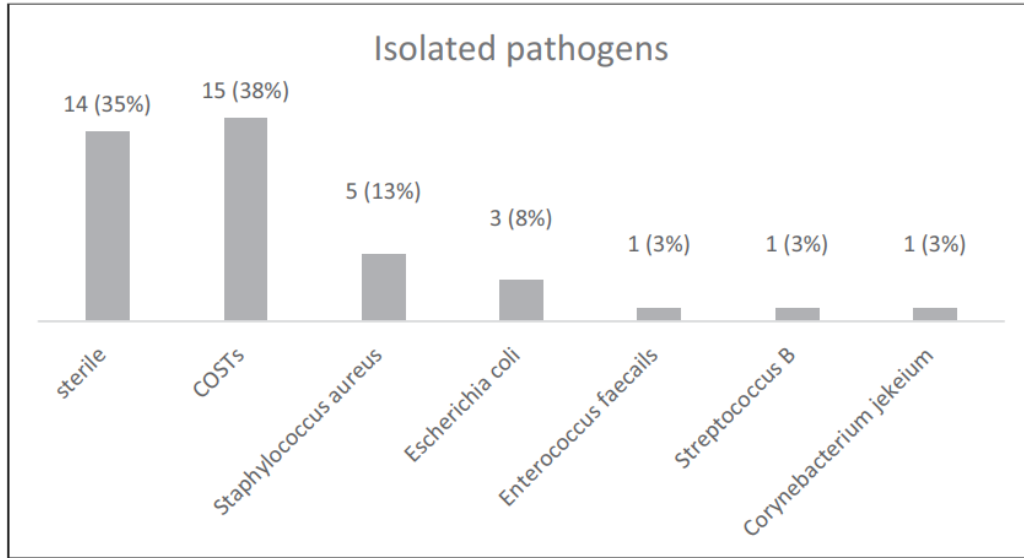
Açık kırıkların sıklığı ve dağılımı coğrafi duruma, sosyoekonomik seviyeye, nüfus yoğunluğuna ve yaralanma mekanizmalarına göre değişiklik göstermektedir. Sanayi bölgesinde yaşayanlarda iş kazaları ve buna bağlı üst ekstremitede açık kırıklar daha fazla gözükürken, kırsal kesimde yaşayanlarda bu oranlar daha düşüktür. 2011 yılında Edingburgh'ta yapılan bir araştırmada açık kırıkların çoğunluğunun üst ekstremitede meydana geldiği gösterilmiştir(Tablo-1), bunu alt ekstremitede tibia kırıkları takip etmektedir (24).

Tablo-2 - Yetişkin hasta grubunda açık kırıkların dağılımı (24).

| | Tüm Hastalar | | | | Erkek | | Kadın | | |
|-----------------|--------------|------|------|-------------|-------------|----------|-------|----------|------|
| | <i>n</i> | % | Yaş | ≥65 yaş (%) | ≥80 yaş (%) | <i>n</i> | % | <i>n</i> | % |
| El parmağı | 1090 | 45.7 | 43.9 | 13.4 | 4.2 | 858 | 52.0 | 232 | 31.5 |
| Tibia ve fibula | 267 | 11.2 | 43.3 | 18.0 | 6.7 | 179 | 10.9 | 88 | 11.9 |
| Distal radius | 184 | 7.7 | 67.0 | 67.4 | 30.4 | 43 | 2.6 | 141 | 19.1 |
| Ayak parmakları | 170 | 7.1 | 41.9 | 11.8 | 1.8 | 112 | 6.8 | 58 | 7.9 |
| Ayak bileği | 126 | 5.3 | 56.7 | 42.9 | 14.3 | 54 | 3.3 | 72 | 9.8 |
| Metakarp | 104 | 4.4 | 34.8 | 7.7 | 4.8 | 94 | 5.7 | 10 | 1.4 |
| Proksimal ulna | 51 | 2.1 | 47.9 | 29.4 | 7.8 | 35 | 2.1 | 16 | 2.2 |
| Metatars | 49 | 2.1 | 42.2 | 14.3 | 8.2 | 39 | 2.4 | 10 | 1.4 |
| Patella | 46 | 1.9 | 36.5 | 10.9 | 4.3 | 33 | 2.0 | 13 | 1.8 |
| Radius ve ulna | 44 | 1.8 | 40.9 | 20.5 | 6.8 | 39 | 2.4 | 14 | 1.9 |
| Femoral diafiz | 43 | 1.8 | 31.8 | 4.7 | 2.3 | 33 | 2.0 | 10 | 1.4 |
| Distal tibia | 31 | 1.3 | 48.1 | 22.6 | 3.2 | 18 | 1.1 | 13 | 1.8 |
| Proksimal tibia | 29 | 1.2 | 47.7 | 24.1 | 10.3 | 17 | 1.0 | 12 | 1.6 |
| Distal femur | 25 | 1.0 | 40.6 | 20.0 | 12.0 | 12 | 0.7 | 13 | 1.8 |
| Ulna diafiz | 25 | 1.0 | 43.2 | 16.0 | 0 | 17 | 1.0 | 8 | 1.1 |

2.14. Açık kırık ve Kontaminasyon

Açık kırık neticesinde ortaya çıkan sorunlardan birisi de kontaminasyondur. Yumuşak doku hasarı ve dolaşımın bozulmasıyla bakteriyel çoğalma için uygun ortam meydana gelir. Açık kırıklardan sonra oluşan enfeksiyon tedavi sürecini güçleştirmektedir. Doku kanlanması bozulmasına eklenen enfeksiyon tablosu neticesinde kaynamama ve kemik defektleri meydana gelmektedir. Oluşan enfeksiyonla mücadele için doku örneklemeleri, seri debritlemeler ve sistemik antibiyotik uygulamaları yapılmaktadır. Enfeksiyon ve devam eden debritlemeler ile kemik dokusunun kaybı söz konusudur. Yapılan araştırmalarda meydana gelen enfeksiyonların sadece %18'inin cerrahi öncesi dönemde alınan kültürlerde izole edilen organizmalarla oluştuğu gösterilmiştir (25). Debritleme öncesinde alınan kültürlerin sonraki dönemde oluşacak enfeksiyonu ve etkenini ön görebilmesi zayıftır (26). Robin Otchwemah ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada enfeksiyona sebebiyet veren en sık organizma koagülaz - safillokok olarak bulunmuştur (27)(Şekil-6).



Şekil-5 - Açık kırıklı olgularda yara kültürlerinden izole edilen organizmalar(27).

2.15. Kemik Defektleri

Kemik defektlerinin rekonstrüksiyonu cerrahlar için zorlu bir süreçtir. Kemik defektleri genellikle uzun kemiklerde görülmekte ve bunlar arasında da en sık tibiada meydana gelmektedir (28). Kemik defektlerinin tedavisinde günümüzde ekstremitte kısaltma, non vaskülerize kemik grefti uygulama, vaskülerize kemik grefti uygulama, indüklenmiş mebran tekniği ve distraksiyon osteogenezisi gibi teknikler kullanılmaktadır(4,29,30). Bu tekniklerin içinde non vaskülerize kemik grefti transferi 6 santimin üzerindeki kemik defektleri için yetersiz kalmaktadır, bu boyutu aşan defektlerde uygulandığı takdirde greftlerde rezorbsiyon gelişmektedir (31).

2.16. İlizarov Tekniği

Defektlerde uygulanan diğer bir teknik İlizarov metodudur (distraksiyon osteogenezisi). Bu teknik Sergei İlizarov tarafından 1960'lerde Rusya'da geliştirilmiştir (32). Distraksiyon osteogenezisi üç fazdan meydana gelmektedir; bunlar latent faz, distraksiyon fazı ve konsolidasyon fazıdır. İlizarov metodunda defekt bölgesindeki kemiğin proksimal veya distal kısmına osteotomi uygulanmaktadır ve bu bölgeden proksimale veya distale doğru uzatma yapılarak defektif kısmın kapatılması amaçlanır. Latent faz uygulanan osteotomi sonrası kırık kaynaması için gereken fizyolojik cevabın oluşmasına izin vermektedir (33). Distraksiyon fazında uzatma işlemi başlamaktadır ve 24 saatte 1 milimetre olacak şekilde uzatma yapılır (33). Son faz olan konsolidasyon fazında ise kapatılan defekt bölgesi ve distekte edilen kemik bölgesinde kaynama dokusunun olgunlaşması beklenir, bu faz distraksiyon fazının yaklaşık iki katı kadar sürmektedir (33). İlizarov metoduyla deformiteler, kemik defektleri, osteomyelit gibi durumlar başarıyla tedavi edilebilmektedir.

İlizarov metodunun bazı komplikasyonları mevcuttur. Bunlardan bir tanesi malzeme gerekliliğidir. İlizarov sisteminin kurulması için şanz, vida, halka, zeytinli tel, menteşe,

rod, pul gibi özel malzemeler gerekmektedir. Sistem kurulduktan sonra kemiğe gönderilen tellerin diplerinde enfeksiyon tablosu sıklıkla görülmektedir. Yumuşak doku nekrozu, damar sinir hasarı, dermatit gibi komplikasyonlar yaşanabilmektedir. Kemik ile ilgili olarak tellerin ve Schanz vidalarının yaratmış olduğu travmaya sekonder kırıklar gelişebilmektedir. İlizarov sisteminin ekleme yakın kurulmak zorunda olduğu durumlarda eklemde sertlik kontraktür ve subluksasyon gelişebilmektedir. Fiksator çıkarımı sonrasında spontan kırıklar gelişebilmektedir. Hasta psikolojisiyle ilgili olarak bazı hastalar eksternal fiksator cihazını kabullenmekte zorluk çekebilmektedir (34).

2.17. Vaskülerize Kemik Grefti

Kemik defektlerinin tedavisinde kullanılan bir diğer yöntem ise vaskülerize kemik grefti uygulamalarıdır. 70'li yıllarda Ostrup ve ark. ile Doi ve ark.'nın çalışmalarında, köpekler üzerinde mikrovasküler teknikle kaburga greftleri mandibulaya transfer edilmiş ve sonuçlarının başarılı olduğu bildirilmiştir (29). Bu çalışmalarda, damarlı kemik greftlerinin medüller ve periostal dolaşımının korunması sonucu canlı kaldığı ve bu şekilde iyileşmenin sağlandığı gösterilmiştir (29). 1975 yılında ise, ilk kez bir klinik olguda, serbest vaskülerize fibula grefti (SVFG) geleneksel kemik greftleme yöntemlerinin başarısız olduğu geniş bir tibia defekti olgusunun rekonstrüksiyonunda Taylor ve ark. tarafından kullanılmıştır (29). Daha sonra çeşitli çalışmalarda, bu yöntemin travma sonrası uzun kemik defektleri, tümör eksizyonu, ve radyasyon sonrası oluşan defektler, doğumsal tibia psödoartrozu, üst ekstremitenin konjenital ve kazanılmış kemik defektleri gibi durumlarda uygulanabilirliği gösterilmiştir (35)

Tarihsel süreçte, vaskülerize kemik greftlerinin kaynamama ve benzeri komplike olgularda geleneksel greftleme yöntemlerinin yerine tercih edilmeye başlanmasındaki ana faktör, patolojik bölgedeki çevresel vasküleritenin yetersizliği olmuştur. Vaskülerize kemik greftlerinde dahili kan akımının devam etmesiyle, kemik

kaynamasına ve greft hipertrofisine olanak sağlanmış olur (29). Bu durum aynı zamanda, grefti enfeksiyona daha dirençli kılar, daha hızlı iyileşme ve hipertrofi nedeniyle mekanik yüklenmeler daha iyi tolere edilebilir ve bu şekilde greft rezorpsiyonu ve stres kırığı insidansı azalır. Ancak bu yöntemin de kısıtlayıcı yönleri bulunmaktadır, yöntem elektif olarak uygulanmak zorundadır (29). Yaşlı ve komorbiditesi olan hastalarda kullanmaya elverişli bir yöntem değildir çünkü ameliyat süreleri oldukça uzundur (29). Yöntem uygulandıktan sonra damar dolaşımının sürekliliğini kontrol etmek çok zordur (29). Donör sahada meydana gelebilecek problemler söz konusudur ve mevcut kemik fibula olduğunda diz ve ayak bileği problemleri meydana gelebilmektedir (29). Cerrahi prosedür uygulanırken alıcı ve verici ekstremitedeki ana arter gözden çıkarılmaktadır(29).

2.18. İndüklenmiş Membran Metodu

2.18.1. Neden Tercih Edilmeli

Büyük kemik defektlerinin klinik yönetimi günümüzde ortopedi cerrahlarını zorlayan tablolardan biridir. Multidisipliner yaklaşım gerektirmesi, tedavinin kompleks olması ve hasta beklentileri ortopedi hekimini bir dizi sorunla karşı karşıya bırakmaktadır. Meydana gelen kemik defektleri ve buna eklenen enfeksiyon durumu klinik tabloyu yönetimi zor bir hale getirmektedir. Bu noktada indüklenmiş membran metodu malzeme gereksiniminin az olması, uygulanabilirliğinin kolay olması ile yeni kemik oluşturmak için ideal tedavi seçeneklerinden biri haline gelmektedir(36).

2.18.2. Tekniğin Tarihi

İndüklenmiş membran tekniği 1980'li yıllarda Alain Masquelet tarafından ortaya konulmuştur(4). Masquelet kaynama problemi olan bir dizi hastada iki aşamalı prosedürü uygulayarak kemik defektinin boyutundan bağımsız şekilde kaynama elde etmiştir (37). Alain Masquelet'in vakalarının başarısı 1992 yılında 1. Avrupa Mikrocerrahi Kongresi'nde tartışılmıştır. Aynı dönemde Alman bilim adamları tarafından da iki aşamalı bir cerrahi prosedür tanımlanmıştır (yayınlanmamış veriler) ancak sonuçlarının başarısız olduğu bildirilmiştir (4). İki öncü çalışma, oluşan membranın başarı için şart olduğunu göstermiştir. Klaue ve arkadaşları tarafından koyun femurları üzerinde yapılan çalışmada kemiklerde 3 santim boyutunda defekt oluşturulmuş ve 1.aşama uygulanmıştır membran korunmadan sadece tek başına greft uygulandığında kaynamanın gerçekleşmediği görülmüştür(38). Pelissier ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada in vitro ortamda indüklenmiş membrandan BMP-2, VEGF, TGF- β gibi osteoindüktif maddelerin salınımı olduğu gösterilmiştir (39).

2.18.3. Tekniğin Açıklanması

İndüklenmiş membran metodu iki aşamadan meydana gelmektedir: birinci aşama debritleme, çimento uygulaması ve fiksasyon aşamalarını içermektedir. Bu aşamada en önemli basamak debritlemedir. Defekt olan bölgede canlılığını yitirmiş, enfektif dokular temizlenmelidir. Debritleme gerçekleştirildikten sonra defekt alanının her iki ucundaki kemikten kanama izlenmesi gerekmektedir. Gerekli şartlar sağlandıktan sonra alana çimento, her iki kemik ucunu kaplayacak şekilde yerleştirilir ve çimentonun bölgede sertleşmesi sağlanır (40). Çimentonun içeride kaldığı sürede etrafında yabancı cisim reaksiyonu meydana gelir bu reaksiyon sonucunda etrafında bir membran oluşur. İlk aşamanın başarıyla tamamlanmasının ardından 6 ila 8 hafta sonrasında ikinci aşama uygulanır (41). Bu aşamada uygulanan çimento dikkatli biçimde etrafında oluşan membrana zarar verilmeden çıkarılır ve debritleme yapılır, her iki kemik ucunun kanlandığı görülmelidir ardından otolog kemik greftleri oluşan

membran içerisine konur ve membran dikkatli bir biçimde kapatılır (42). Membran kapatılırken zarda herhangi bir gerginlik olmamalıdır (4). Stabilizasyon yeterli ise ek bir müdahaleye gerek yoktur fakat stabilizasyonun yeterli olmadığı durumlarda çivi veya plak uygulaması ile stabilizasyon artırılabilir(43).

2.18.4. Tekniğin Kullanım Endikasyonları

Yüksek enerjili travmalar sonrasında oluşan kemik defektleri, tümör rezeksiyonları, osteomyelit, kaynamama, konjenital pseudoartroz gibi klinik tablolarda başarıyla uygulanmaktadır (44).

2.18.5. İndüklenmiş Membran

Defekt bölgesine konan kemik çimentosu yabancı cisim reaksiyonu meydana getirmektedir ve bu reaksiyon neticesinde indüklenmiş membran oluşmaktadır(39).Membran histolojik olarak vaskülerize kalın yapılı olup kemik oluşumunu indükleyici maddeler salgılamaktadır. Bu maddeler arasında başlıca BMP-2, VEGF, IL 1-6, TGF- β sayılabilir. Bu maddelerin salınımı koyun, keçi, tavşan, fare gibi hayvan modellerinde ortaya konulmuştur (4,35). Christou ve arkadaşlarının koyun humerusları üzerinde yapmış olduğu bir deneyde koyun humeruslarında kemik defekti meydana getirilmiş ve ardından kemik çimentosu uygulanmıştır 4 haftalık takibin ardından oluşan indüklenmiş membranlar incelenmiş ve VEGF, IL-6, IL-8, VWF, TGF- β , BMP-2 salınımı gösterilmiştir(45). İnsan üzerinde yapılan çalışmalar membranın biyolojik özelliklerini daha iyi anlamamızı sağlamıştır. İndüklenmiş membranın bazı araştırmalarda mezenkimal hücelere benzer hücreler ihtiva ettiği ortaya konmuştur (4). Cuthbert ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada

indüklenmiş membran metoduyla tedavi edilen 8 hastada oluşan membranlardan örnek alınmış ve incelenmiştir bunun neticesinde membran ve periost arasında birçok benzerlik olduğu ve indüklenmiş membranın periosttan daha kalın bir yapıya sahip olduğu gösterilmiştir aynı çalışmada bu benzerlikten ötürü membran için indüklenmiş periost ifadesi kullanılmıştır(46).

2.18.6. Kemik Çimentosu

‘Çimento’ kavramı ortopedi ve travmatoloji tarihinde ilk olarak Alman bilim adamı Themistokles Gluck tarafından kullanılmıştır. Gluck, fildişinden imal ettiği diz protezini kemiğe daha iyi tespit edebilmek için alçı, bakır amalgam ve toz macun karışımını kullanmıştır(47).

Günümüzde kemik çimentosu için kullanılan materyal polimetilmetakrilat (PMMA)’dır. Otto Röhm, metilmetakrilatın kimyasal ve fiziksel özelliklerini ilk tanımlayan araştırmacıdır(48). PMMA’nın klinik olarak ilk kullanımı, 1938 yılında maymunlarda kraniyal defektlerin kapatılması amacıyla gerçekleşmiştir(49). 1941 yılına gelindiğinde ise insanlar üzerinde kraniyal defektlerin kapatılması amacıyla kullanımına başlanmıştır(50). İlerleyen dönemlerde önce diş hekimliği alanında ardından da ortopedi alanında kullanıma girmiştir(50).

1957 yılında Wiltse ve ark., kemik çimentosunun ortopedik cerrahi alanında kullanılabilir bir materyal olduğunu belirterek çimentonun potansiyel yararlarını deneysel olarak ortaya koymuşlardır. 1958 yılında Sir John Charnley, paslanmaz çelik femoral stem ve yüksek yoğunluklu polietilen asetabular komponentleri ilk kez çimento ile uygulamış, akabinde 1960’ta erken dönem sonuçlarını yayımlamıştır. Çimentolu uygulamalar sonrası sekiz yıllık takiplerde sadece %2 oranında başarısızlık

rapor edilmiştir. Avrupa’da protez cerrahisinde kullanımından yaklaşık 10 yıl sonra 1970’lerde Amerikan Besin ve İlaç Dairesi (FDA), PMMA’nın diz ve kalça protezlerinde kullanımına onay vermiştir(51,52,53,54).

2.18.7. Çimento ve Membran İlişkisi

Yapılan farklı araştırmalarda uygulanan çimento türünün membran yapısını etkilediği gösterilmiştir(4).Gaio ve arkadaşlarının ratlar üzerinde yapmış olduğu bir çalışmada kemik defekti meydana getirildikten sonra defekt bölgesine yüzeyi pürüzlü ve pürüzsüz olan kemik çimentosu ile yine yüzeyi pürüzlü ve pürüzsüz titanyum spacer yerleştirilmiştir deney sonucunda membranların elastik modülüsü ve histolojik düzeninin farklı olduğu görülmüştür. Nau ve arkadaşlarının ratlar üzerinde yapmış olduğu bir başka çalışmada ise çimento içerisine eklenen antibiyotiğin membran histolojisini ve morfolojisini belirgin olarak değiştirdiği gösterilmiştir. Shah ve arkadaşlarının ratlar üzerinde yapmış olduğu bir çalışmada enfekte ve enfekte olmayan kemik defektlerine klindamisinli ve normal çimento konarak kıyaslama yapılmış iki grup arasında büyüme faktörleri açısından fark gösterilememiştir(55,56,57,58). Metodu bulan kişi olan Alain Masquelet kullanılacak en iyi çimento tipinin antibiyotiksiz polimetilmetakrilat (PMMA) olduğunu belirtmiştir(4).

2.18.8. İkinci Aşama Uygulama Zamanı

İkinci aşamanın uygulanma zamanıyla ilgili olarak literatürde farklı zamanlar bildirilmiştir (59). Masquelet’e göre ikinci aşama için uygun zaman 8. haftadır. Hayvanlarda yapılan araştırmalarda farklı sonuçlar ortaya konmuştur. Wang ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada ikinci haftadan itibaren büyüme faktörlerinin salındığı ve 4. ile 6. hafta arasında maksimum düzeye eriştiği gösterilmiştir aynı zaman aralığında membranında en kalın formuna ulaştığı belirtilmiştir (60). Yapılan bir diğer çalışmada tavşanlarda damar oluşumunun ve

BMP-2 salınımının 4. haftada maksimum düzeyde olduğu VEGFnin ise 2. ila 6. haftalar arasında maksimum seviyeye ulaştığı gösterilmiştir (61).

Aho ve arkadaşlarının yapmış olduğu başka bir çalışmada insanda 2. aşama için ideal zamanın 1 ayı geçmemesi gerektiği belirtilmiş, 1 aydan sonra osteoindüktif (kemik oluşumunu sağlayan) kapasitenin belirgin olarak düştüğü gösterilmiştir (62).

2.18.9. Kemik Grefti Uygulamaları

İkinci basamakta çimento çıkarıldıktan sonra membran içerisine hastadan alınan otogreft(kişinin kendisinden alınan doku) uygulanmaktadır alınan kemik grefti defekti dolduracak miktarda olmalıdır. Greft almak için özel cihazlar bulunmaktadır (32,63,64). Ancak bazı durumlarda bu greft miktarı yeterli gelmemektedir. Bu gibi durumlarda allogreft, ksenogreft, sentetik greftler kullanılabilir (4,65). Otogreft ile allogreft arasında olması gereken oran tartışma konusudur. Masquelet ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada bu oran %70 otogreft %30 allogreft şeklinde belirtilmiştir (40, 66). Membran içerisindeki otogreft oranı düştükçe kemiğin kaynaması zorlaşacaktır(38).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Deney erkek Yeni Zelanda tavşanlarında gerçekleştirilmiştir. Deney grubuna 2 aylık erkek Yeni Zelanda tavşanları dahil edilmiş olup, kilo ortalamaları 2-3 kg arasındadır.

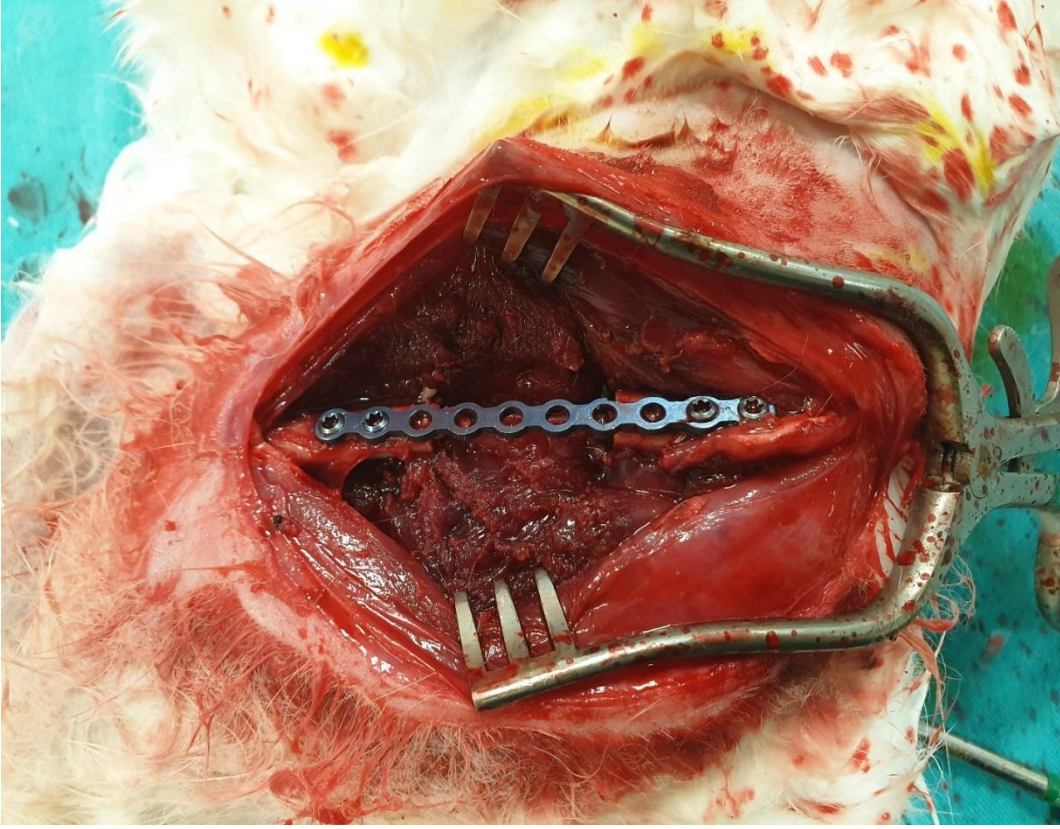
3.1. Deney Grupları

1. antibiyotiksiz çimento grubu: 9 adet erkek Yeni Zelanda tavşanı
2. vankomisinli çimento grubu: 9 adet erkek Yeni Zelanda tavşanı
3. gentamisinli çimento grubu: 9 adet erkek Yeni Zelanda tavşanı

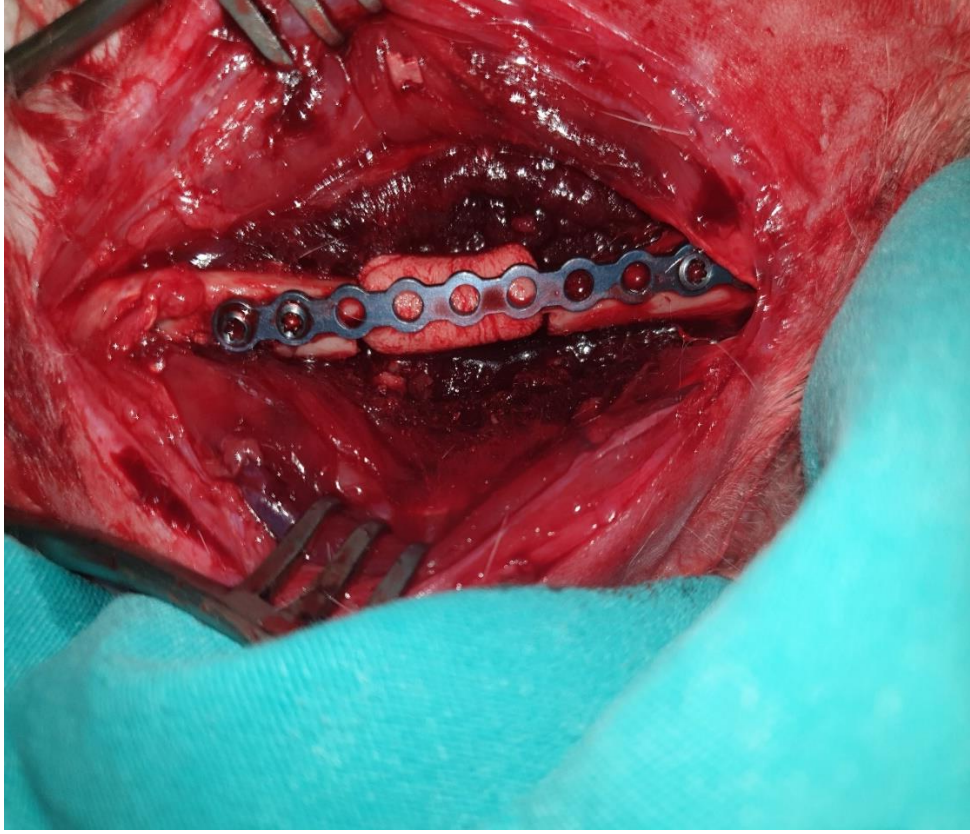
3.2. Cerrahi Prosedür

Bu çalışma Nisan-Mayıs 2020 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından 25.01.2018 tarihinde 639 no'lu dosya kayıt numarasıyla onay alınmasının ardından gerçekleştirilmiştir. Tavşanlara 44 mg/kg ketamin hcl ve 5mg/kg ksilazin anestezisi intramuskuler yol ile uygulandı ardından antibiyotik profilaksisi olarak 20 mg/kg sefazolin uygulaması yapıldı. Anestezi sonrası ameliyat edilecek tavşanların sol femuru üzerindeki bölge tıraşlandı. Lateral dekübit pozisyonunda operasyon masasına alınan tavşanların cerrahi alanı Poviiodexs antiseptik çözelti ile sterilize edildi. 11 no'lu bisturi ile insizyon yapıldı biceps femoris ile tensör fasya lata kasları arasından femura ulaşıldı. Femur diafizi üzerinde ki periost periost elevatörü kullanılarak uzaklaştırıldı, ardından femur orta kesiminde 2cm uzunluğunda alan işaretlendi, kemik testeresi ile proksimal ve distal kesiminden kesildi. Hazırlanan 2 mm kalınlığındaki titanyum alaşım 10 delikli mini plak kemik üzerine yerleştirildi, plağın proksimal ve distal bölgesinde kalan iki delik matkap ile delindi ve bu deliklere 2 milimetrelik kilitli ikişer adet toplamda dört vida yerleştirildi ve plak fiksasyonu sağlandı. Defekt bölgesine ameliyat öncesinde elle karılarak hazırlanan silindirik şekilli 2cm uzunluğunda 1cm çapındaki çimento

materyali uygulandı (biofix 1 cement-synimed) ve insizyon 3.0 prolén sütür (ethicon) ile anatomik olarak dikildi. Tavşanlar altı hafta süreyle Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezin’de 25-35 derece sıcaklıkta, hava akım ve ışık şiddeti kontrollü odalarda (kafes başına 40 lüks) 12 saat gündüz, 12 saat gece olacak şekilde şeffaf kafeslerde takip edildi. Tavşanlar Esyem tavşan yemi ile ad libitum (hayvanın önünde sürekli yem bulunması) şeklinde beslendi ve musluk suyu verildi. Takip sürecinde yara yerleri ameliyat sonrası dönemde 24.-72. saatlerde kontrol edildi bunun ardından haftalık kontrole geçildi ve bu süreçte cerrahi alanda herhangi bir enfeksiyon bulgusu veya yara yeri ayrışması görülmedi. Altı hafta sonra tavşanlar ketamin 44 mg/kg ve 5 mg/kg ksilazin anestezisi altında tekrar ameliyata alındı. Eski insizyon skarı üzerinden tekrar insizyon açıldı ve oluşturulan defekt bölgesine ulaşıldı. Çimento etrafında biyolojik membran oluştuğu makroskopik olarak görüldü(şekil-6,7,8). Cerrahi esnasında herhangi bir enfeksiyon bulgusuna rastlanmadı. Histolojiye gönderilmek üzere örnekler alındı. Ameliyatın tamamlanmasının ardından tavşanlar anestezisi altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi.



Şekil-6- Osteotomize edilmiş ve plak uygulanmış tavşan femuru



Şekil-7- Defekt bölgesine kemik çimentosu uygulanması



Şekil-8- Kemik çimentosu etrafında oluşmuş indüklenmiş membran

3.3. Histolojik Gereç ve Yöntem

3.3.1. Hematoksilen-eozin boyama

Hayvanlardan elde edilen membran dokular, %0,9'luk NaCl çözeltisi içinde hızlıca yıkanarak kandan arındırılarak %10'luk formaldehit içerisinde alındılar. 24 saatlik bekleme sonrasında dokular akar çeşme suyu altında yıkayıp artan derecelerdeki etanolden (sırasıyla %70, %80, %96 ve %100'lük) geçirildiler. Ksilen ile ışık geçirgen hale getirildikten sonra önce yarı yarıya karıştırılmış ksilen-sıvı parafin karışımından, ardından 3 farklı sıvı parafinden geçirilip parafin bloklar haline getirildiler. Parafin bloklardan mikrotom ile 5 µm kalınlığında seri kesitler alınarak genel histopatolojik inceleme için hematoksilen-eozin (H-E) tekniği ile boyandılar.

3.3.2. Genel Histolojik İnceleme

Her doku kesitinde 40X objektif ile 5 farklı alan incelenerek puanlama yapıldı. Sonuçta her hayvan için bir puan belirlendi. Ödem, dev hücrelerin ve küçük çaplı kan damarlarının varlığı ve dağılımı dikkate alınarak puanlama şu şekilde yapıldı; bu bulgular yoksa 0, az veya hafif ise 1, orta derecede ise 2, çok veya yaygın ise 3 puan verildi(45).

3.3.3. İmmünohistokimyasal Boyama

Parafin bloklardan lamlara 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler 60°C etüvde 1 saat bekletildikten sonra, 3x5 dakika ksilole alınarak deparafinizasyonları sağlandı. Lamlar sırasıyla azalan alkol (%100, %96, %80, %70) serilerinden geçirildi, ardından kesitler 1'er dakika distile sudan geçirildi. Antigen maskesini kaldırmak için

1/10 oranında seyreltilmiş sitrat tamponu (p:6) (AP-9003-999 Thermo scientific) PT Modülü (A80400012 Lab Vision) ile uygulandı. İmmunohistokimya boyama cihazında rack yuvalarına lamlar lamelle birlikte takıldı. PBS ile 5 dakika yıkama yapıldı. 10 dakika %3'lük hidrojen peroksit (TA-125-HP ThermoScientific) ile etkin bırakılan endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. PBS ile yıkanan dokular 5 dakika blok solusyonuyla (TA-125-PBQ ThermoScientific) bloke edildi. Preparatlara von Willebrand faktörü (vWF), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- b), kemik morfojenik proteini 2 (BMP-2), interlökin 6 (IL-6) ve interlökin 8 (IL-8) antikoları uygulandı. +4 derece sıcaklıkta 1 gece inkube edilen preparatlar, ertesi gün PBS ile 5 dakika yıkandı ve AEC Kromojeni (TA-125-HA Thermo Scientific) ile boyandı. Zemin boyaması için 30 saniye süreyle hematoksilen (HHS32 Sigma) kullanıldı. Distile su hematoksilen fazlası uzaklaştırıldı. Lamlar havada kurutuldu. Ardından su bazlı kapama solusyonuyla (TA-125-UG Thermo Scientific) ile kapatıldı.

3.3.4. İmmunohistokimyal inceleme

Kesitler mikroskop altında incelenerek uygulanan antikorun dokudaki dağılımı (yüzeyde, derinde veya her ikisinde), boyanmanın yoğunluk derecesi (hafif, orta, kuvvetli) ve miktarı (az, orta, çok) dikkate alınarak 0-3 arasında puan verildi (45) Histolojik inceleme yapılan membranlardan elde edilen veriler istatistiksel olarak karşılaştırıldı. (Histolojik değerlendirme neticesinde elde edilen skor değişkenler için 3 grup karşılaştırılması öncelikle krusskal wallis testi ile yapıldı. Test sonucu anlamlı çıkan skor değişkenler Dunn test ile ikili gruplar olarak karşılaştırıldı. Medyan, Q1 ve Q3 tanımlayıcı istatistikleri grup değerlendirmesinde kullanıldı. Analizlerin uygulanmasında IBM SPSS Statistics 21.0 programından yararlanılmıştır. İstatistiksel önemlilik için $p < .05$ değeri kriter kabul edildi.)

4.BULGULAR

Yapılan istatistiksel değerlendirmede kontrol grubu ve antibiyotikli grup (vankomisin ve gentamisin) birbirleriyle karşılıklı olarak incelendi. Kontrol ve antibiyotikli grubun histolojik bulguları yapılan Kruskal Wallis testine göre hemotoksilen eozin boyama, VEGF, WVF, TGF- β , IL6 sonuçları kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek idi ($p < .05$). BMP-2 ve IL-8 değerleri histolojik skorlamada yüksek çıkmasına karşılık istatistiksel değerlendirmede gruplar arasında fark bulunamadı. Sonrasında anlamlı çıkan değişkenler için Dunn test ile gruplar ikili olarak karşılaştırıldı.

4.1 Genel Histolojik Bulgular (Hemotoksilen-Eozin(H-E))

Deney gruplarından elde edilen membranlara ait temsili mikroskopik görüntüler aşağıda şekil-7 ve 8'de gösterilmiştir. Buna göre, antibiyotik uygulanmayan kontrol grubunda membran indüksiyonunun diğer iki gruba göre daha belirgin olduğu belirlenmiştir. Çok ekirdekli dev hücre sayısının fazla olması ve ödemli alanların genişliği dikkati çekmiştir. Gentamisin uygulanan grupta dev hücelere ve ödemli alanlara daha az rastlandı. Vankomisin uygulanan grupta ise dev hücelere ve ödemli alanlara neredeyse hiç rastlanmadı. Kan damarları ise tüm gruplarda membranın değişik bölgelerinde yerine göre az veya çok sayıda olacak şekilde izlendi. Sonuçta membran indüksiyonu ortalama puanı kontrol grubu için 2.71, gentamisin grubu için 0.89 ve vankomisin grubu için 0.22 olarak saptandı. Yapılan istatistiksel değerlendirmede antibiyotikli grup ile antibiyotiksiz grup arasındaki fark anlamlı (gentamisin için $p = .20$; vankomisin için $p < .001$), antibiyotikli grupların arasında yapılan değerlendirmede ise gentamisin ve vankomisin grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. ($p = .323$)

4.2 İmmünohistokimyasal bulgular:

4.2.1. BMP-2

Deney gruplarından elde edilen membranlara ait temsili mikroskopik görüntüler aşağıda Şekil-14'da gösterilmiştir. Buna göre, antibiyotik uygulanmayan kontrol grubunda membran dokusunda BMP-2 ekspresyonunun daha yaygın ve yoğun olduğu, gentamisin uygulanan grupta ekspresyonun biraz azaldığı, vankomisin grubunda da hafif bir azalma olduğu izlendi. Sonuçta ekspresyon ortalama puanı antibiyotiksiz grup için 1.89, gentamisin grubu için 1.56 ve vankomisin grubu için 1.44 olarak saptandı.. Ancak yapılan istatistiksel incelemede farkın anlamlı olmadığı ortaya konmuştur. ($p = .256$)

4.2.2. VEGF

Deney gruplarından elde edilen membranlara ait temsili mikroskopik görüntüler aşağıda Şekil-12'te gösterilmiştir. Buna göre, antibiyotik uygulanmayan kontrol grubunda membran dokusunda VEGF ekspresyonunun daha yaygın ve yoğun olduğu, gentamisin uygulanan grupta ekspresyonun azaldığı, vankomisin uygulanan grupta da belirgin bir azalma olduğu izlendi. Sonuçta ekspresyon ortalama puanı kontrol grubu için 2.11, gentamisin grubu için 1.11 ve vankomisin grubu için 0.11 olarak saptandı. Yapılan istatistiksel incelemede elde edilen skorlar arasında anlamlı fark saptanmıştır ($p < .001$). Antibiyotikli gruplar arasında yapılan incelemede gentamisin grubunda VEGF skorlarının vankomisin grubuna göre daha yüksek çıktığı saptanmıştır ($p = .048$).

4.2.3. VWF

Deney gruplarından elde edilen membranlara ait temsili mikroskopik görüntüler aşağıda Şekil-11'de gösterilmiştir. Buna göre, antibiyotik uygulanmayan kontrol grubunda membran dokusunda vWF ekspresyonunun daha yaygın ve yoğun olduğu, gentamisin uygulanan grupta ekspresyonun neredeyse benzer olduğu, ancak vankomisin grubunda belirgin olarak azaldığı izlendi. Sonuçta ekspresyon ortalama puanı kontrol grubu için 2.22, gentamisin grubu için 2.00 ve vankomisin grubu için 1.00 olarak saptandı. Yapılan istatistiksel incelemede elde edilen skorlar arasında anlamlı fark saptanmıştır ($p < .001$). Antibiyotiksiz ve gentamisin grubu arasındaki fark anlamlı bulunamamışken ($p = 1.00$), antibiyotiksiz ve vankomisin arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p < .001$). Gentamisin ve vankomisin grubu arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlıdır ($p = .005$).

4.2.4. TGF- β

Deney gruplarından elde edilen membranlara ait temsili mikroskopik görüntüler aşağıda Şekil-13'te gösterilmiştir. Buna göre, antibiyotik uygulanmayan kontrol grubunda membran dokusunda TGF-b ekspresyonunun daha yaygın ve yoğun olduğu, gentamisin uygulanan grupta ekspresyonun azaldığı, vankomisin uygulanan grupta da belirgin bir azalma olduğu izlendi. Sonuçta ekspresyon ortalama puanı kontrol grubu için 2.11, gentamisin grubu için 1.89 ve vankomisin grubu için 1.44 olarak saptandı. Yapılan istatistiksel incelemede elde edilen skorlar arasında anlamlı fark saptanmıştır ($p = .011$). Vankomisin ve antibiyotiksiz grup arasındaki fark anlamlı iken ($p = .010$) gentamisin-vankomisin grupları arasındaki fark ve gentamisin antibiyotiksiz grupları arasındaki fark anlamlı değildir (gentamisin-vankomisin grupları için $p = .130$; gentamisin antibiyotiksiz grup için $p = 1.00$).

4.2.5. IL6

Deney gruplarından elde edilen membranlara ait temsili mikroskobik görüntüler aşağıda Şekil-15’de gösterilmiştir. Buna göre, antibiyotik uygulanmayan kontrol grubunda membran dokusunda İL-6 ekspresyonunun daha yaygın ve yoğun olduğu, gentamisinli çimento uygulanan grupta ve vankomisinli çimento verilen grupta kontrol grubuna göre hafif bir azalma olduğu izlendi. Gentamisin ve vankomisin verilen gruplar birbirine benzer bir ekspresyon gösterdiler. Sonuçta ekspresyon ortalama puanı kontrol grubu için 2.89, gentamisin grubu için 2.33 ve vankomisin grubu için 2.33 olarak saptandı.

Kruskal Wallis testi IL6 açısından en az bir grubun diğerlerinden farklı olduğu yönde bir sonuç vermektedir ancak Dunn testi anlamlı fark yaratan grup ikilisini belirlemede başarılı olamamıştır. Bu durum skor değişkenlerden kaynaklanmaktadır. Gruplar homojen değildir ama bunun sebebi skor ölçüm olmasından ötürü net bir şekilde belirlenememiştir.

4.2.6. IL8

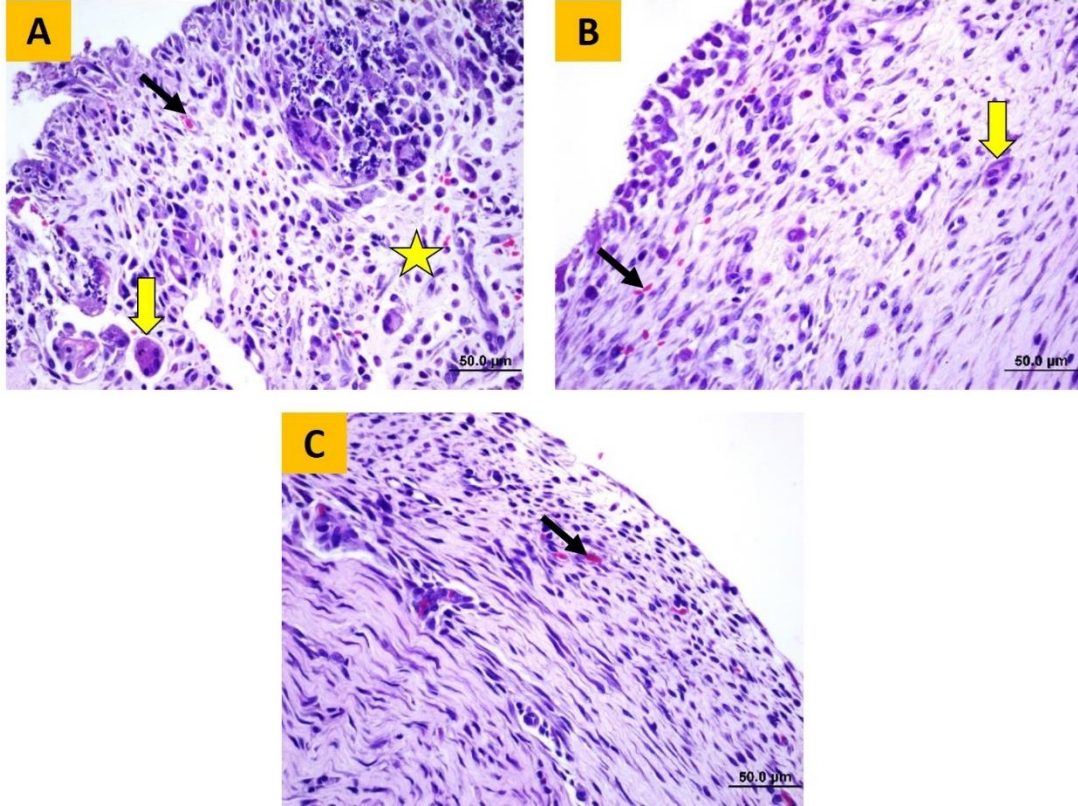
Deney gruplarından elde edilen membranlara ait temsili mikroskobik görüntüler aşağıda Şekil-16’de gösterilmiştir. Buna göre, antibiyotik uygulanmayan kontrol grubunda membran dokusunda İL-8 ekspresyonu hafifçe daha yoğun boyanma göstermiş olsa da gentamisin uygulanan grupta ve vankomisin verilen grupta da kontrol grubuna benzer bir ekspresyon olduğu izlendi. Genel olarak tüm gruplar birbirine benzer bir ekspresyon gösterdiler. Sonuçta ekspresyon ortalama puanı kontrol grubu için 2.22, gentamisin grubu için 2.00 ve vankomisin grubu için 2.00 olarak saptandı. İstatiksel incelemede antibiyotikli ve antibiyotiksiz gruplar arasındaki fark anlamlı değildir ($p = .366$).

Tablo-3 – Histolojik inceleme skorları**0: yok, 1: az, 2: orta, 3: çok**

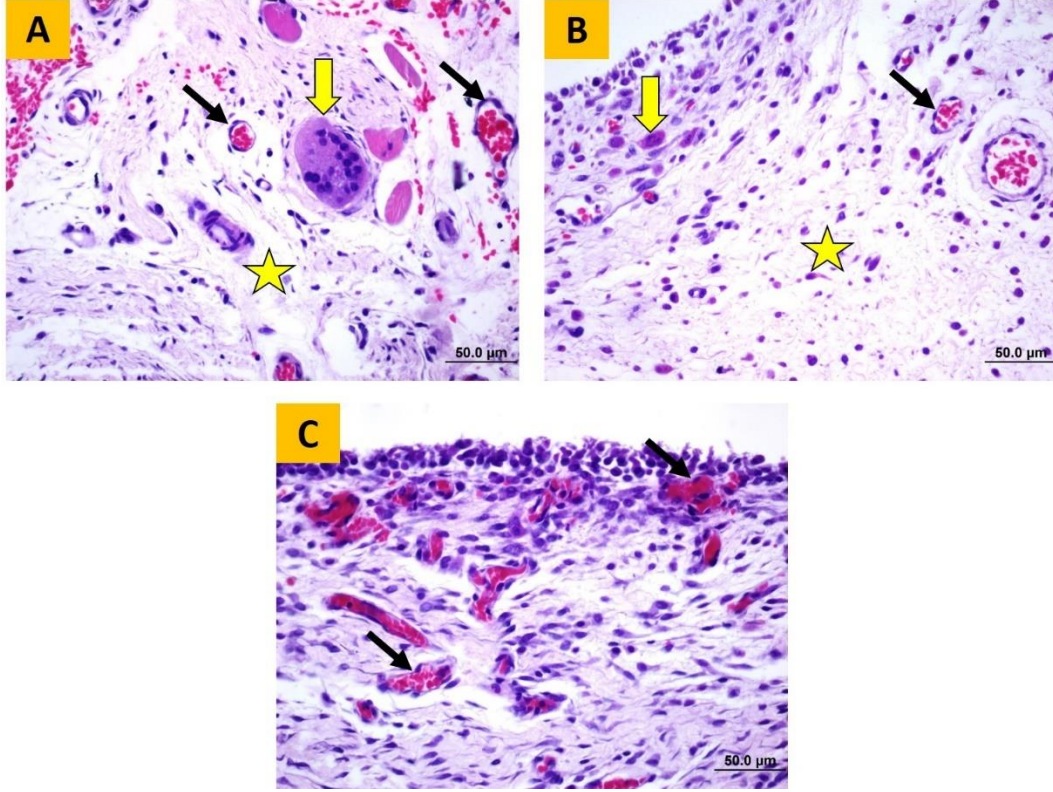
| | H-E | BMP-2 | VEGF | vWF | TGF-b | IL-6 | IL-8 |
|------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| ANTİBİYOTİK SİZ | | | | | | | |
| 1 | 3 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 |
| 2 | 3 | 1 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 |
| 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 4 | 0 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 2 |
| 5 | 0 | 1 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 |
| 6 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 | 3 | 2 |
| 7 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 |
| 8 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 |
| 9 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 |
| Toplam | 19/7= 2,71 | 17/9= 1,89 | 19/9= 2,11 | 20/9= 2,22 | 19/9= 2,11 | 26/9= 2,89 | 20/9= 2,22 |
| GENTA MİSİN | | | | | | | |
| 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 3 | 3 |
| 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 3 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 4 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 3 | 2 |
| 5 | 1 | 2 | 1 | 3 | 2 | 2 | 2 |
| 6 | 1 | 2 | 1 | 3 | 1 | 3 | 2 |
| 7 | 0 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 8 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 9 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 |
| Toplam | 8/9= 0,89 | 14/9= 1,56 | 10/9= 1,11 | 18/9= 2 | 17/9= 1,89 | 21/9= 2,33 | 18/9= 2 |
| VANKO MİSİN | | | | | | | |
| 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 2 | 2 |
| 2 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 2 | 2 |
| 3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 |
| 4 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 2 | 2 |
| 5 | 0 | 1 | 0 | 1 | 2 | 3 | 2 |
| 6 | 0 | 2 | 0 | 1 | 2 | 2 | 2 |
| 7 | 0 | 2 | 0 | 1 | 2 | 3 | 2 |
| 8 | 1 | 2 | 0 | 1 | 1 | 2 | 2 |
| 9 | 0 | 2 | 0 | 1 | 2 | 3 | 2 |
| Toplam | 2/9= 0,22 | 13/9= 1,44 | 1/9= 0,11 | 9/9= 1,00 | 13/9= 1,44 | 21/9= 2,33 | 18/9= 2 |

Tablo 4 – İstatistiksel veriler tablosu

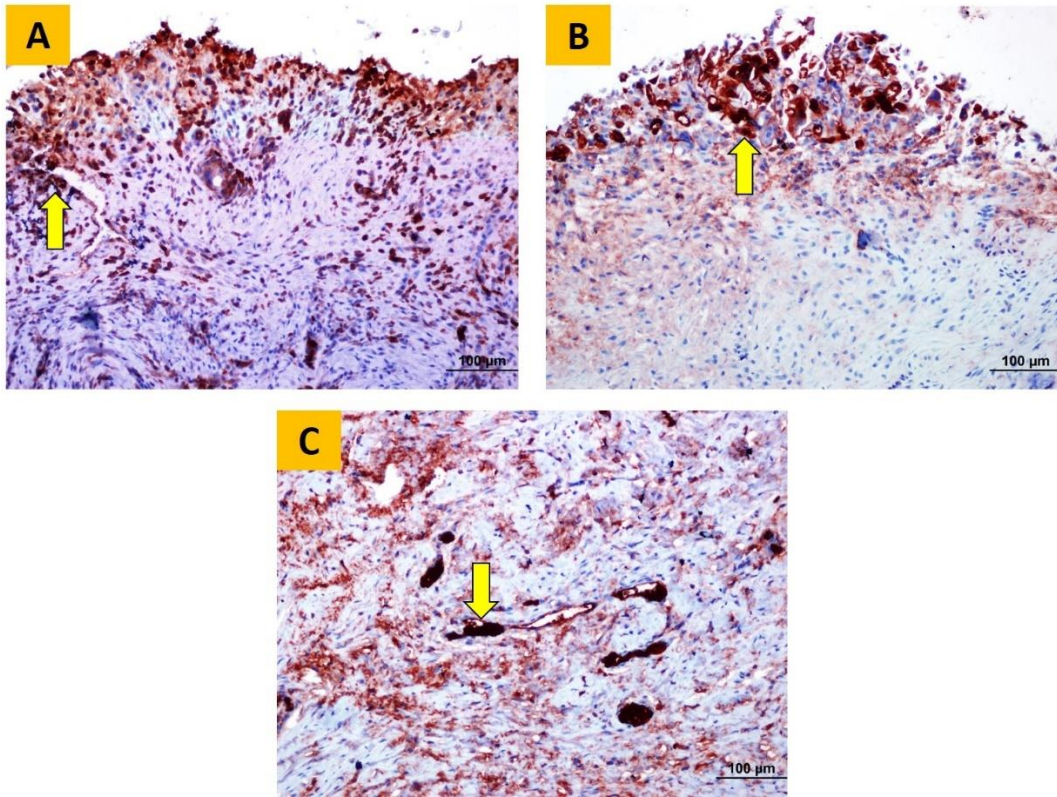
| Değişkenler | Gruplar | Medyan (Q1-Q3) | Kruskal Wallis | <i>p</i> değeri |
|-------------|------------|----------------|----------------|-----------------|
| HE | Kontrol | 3 (2-3) | 11.432 | <.001 |
| | Gentamisin | 1 (1-1) | | |
| | Vankomisin | 0 (0-0) | | |
| BMP2 | Kontrol | 2 (2-2) | 2.727 | 0.256 |
| | Gentamisin | 2 (1-2) | | |
| | Vankomisin | 1 (1-2) | | |
| VEGF | Kontrol | 2 (2-2) | 23.209 | <.001 |
| | Gentamisin | 1 (1-1) | | |
| | Vankomisin | 0 (0-0) | | |
| VWF | Kontrol | 2 (2-2) | 16.832 | <.001 |
| | Gentamisin | 2 (2-2) | | |
| | Vankomisin | 1 (1-1) | | |
| TGF- | Kontrol | 2 (2-2) | 9.026 | .011 |
| | Gentamisin | 2 (2-2) | | |
| | Vankomisin | 1 (1-2) | | |
| IL6 | Kontrol | 3 (3-3) | 7.143 | .028 |
| | Gentamisin | 2 (2-3) | | |
| | Vankomisin | 2 (2-3) | | |
| IL8 | Kontrol | 2 (2-2) | 2.009 | .339 |
| | Gentamisin | 2 (2-2) | | |
| | Vankomisin | 2 (2-2) | | |



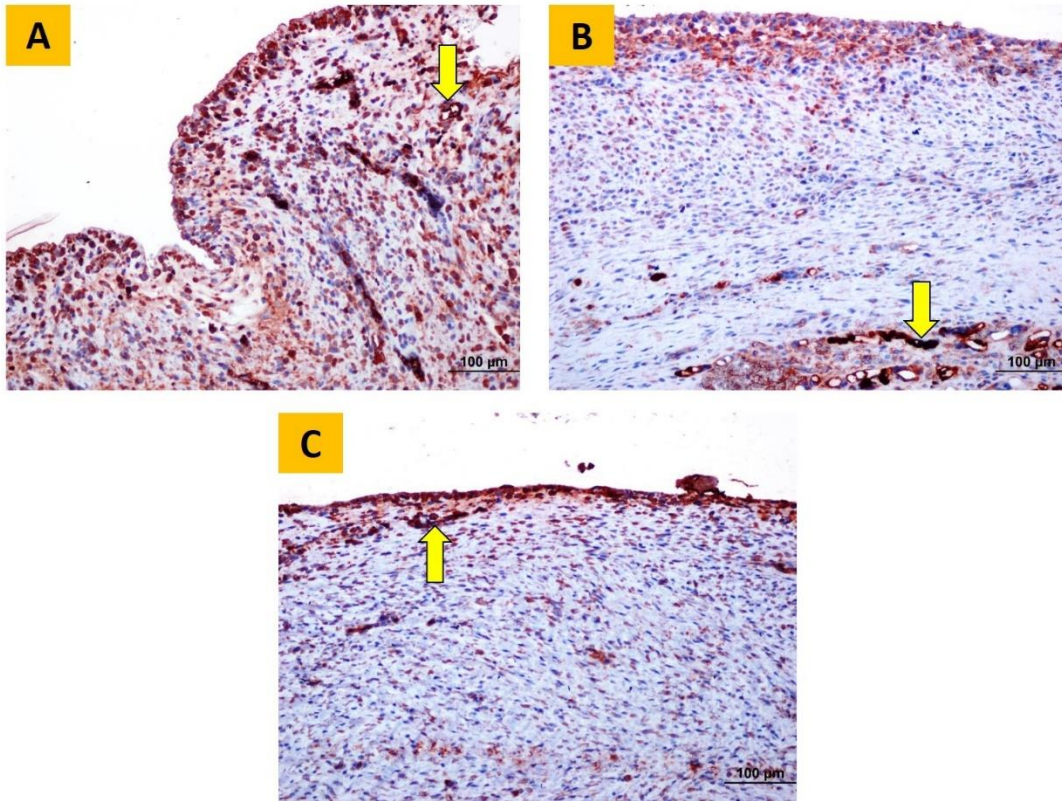
Şekil-9 - Deney gruplarına ait membran dokularının histolojik görüntüleri izlenmektedir. **A:** Antibiyotik uygulanmayan kontrol grubunda düzensiz membran yüzeyi, geniş ödemli alan (*yıldız*), bir dev hücre (*kalın ok*) ile küçük kılcal damar (*ince ok*) görülmektedir. **B:** Gentamisinli çimento uygulanan grupta membran yüzeyinin daha düzenli olduğu, dev hücrelerin azaldığı (*kalın ok*) ve kılcal damarların (*ince ok*) varlığını sürdürdüğü görülmektedir. **C:** Vankomisinli çimento uygulanan grupta membran yüzeyinin düzenli olduğu, dev hücrelerin kaybolduğu ve kılcal damarların (*ince ok*) varlıklarını sürdürdükleri izlenmektedir. Tüm barlar 50 µm'dir, (hematoksilen-eozin ile boyanma).



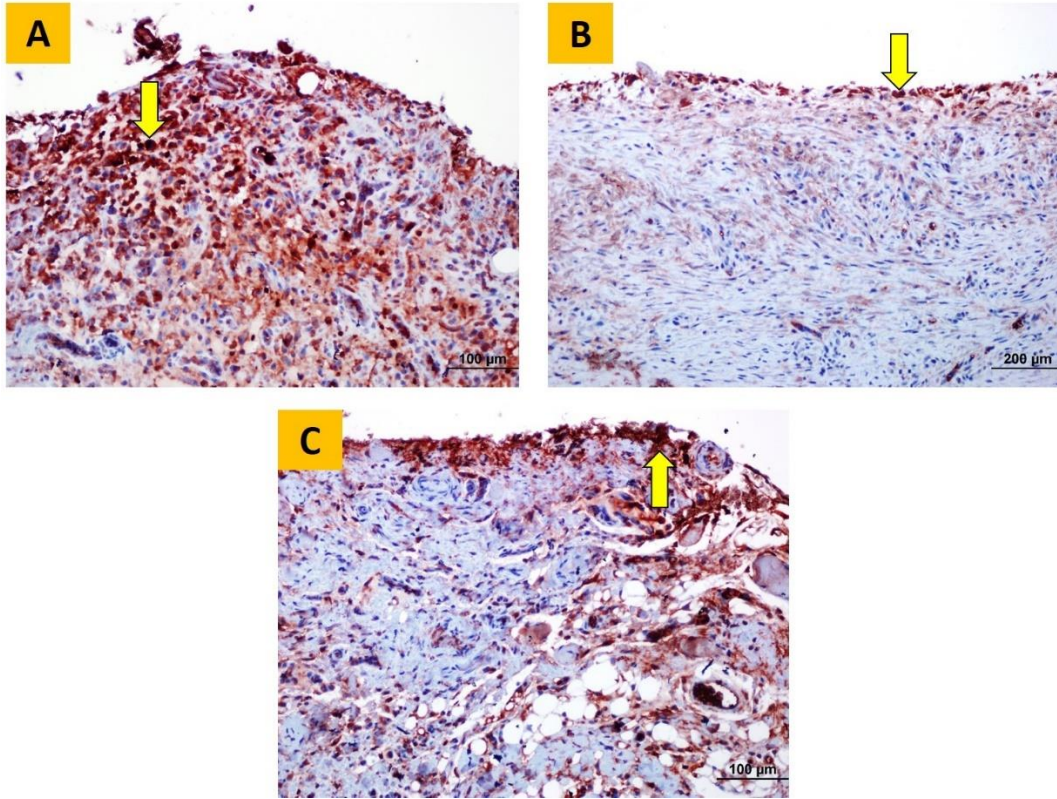
Şekil-10 - Deney gruplarına ait membran dokularının histolojik görüntüleri izlenmektedir. **A:** Antibiyotik uygulanmayan kontrol grubunda geniş ödemli alan (*yıldız*), bir dev hücre (*kalın ok*) ile küçük kılcal damarlar (*ince oklar*) görülmektedir. **B:** Gentamisinli çimento uygulanan grupta ödemli alanın (*yıldız*) varlığını sürdürdüğü, dev hücrelerin sayıca azalarak küçüldüğü (*kalın ok*) ve kılcal damarların (*ince ok*) ortamda bulunmaya devam ettiği görülmektedir. **C:** Vankomisinli çimento uygulanan grupta dev hücrelerin kaybolduğu ve kılcal damarların (*ince oklar*) varlıklarını sürdürdükleri izlenmektedir. Tüm barlar 50 µm'dir.(hematoksilen-eozin ile boyama)



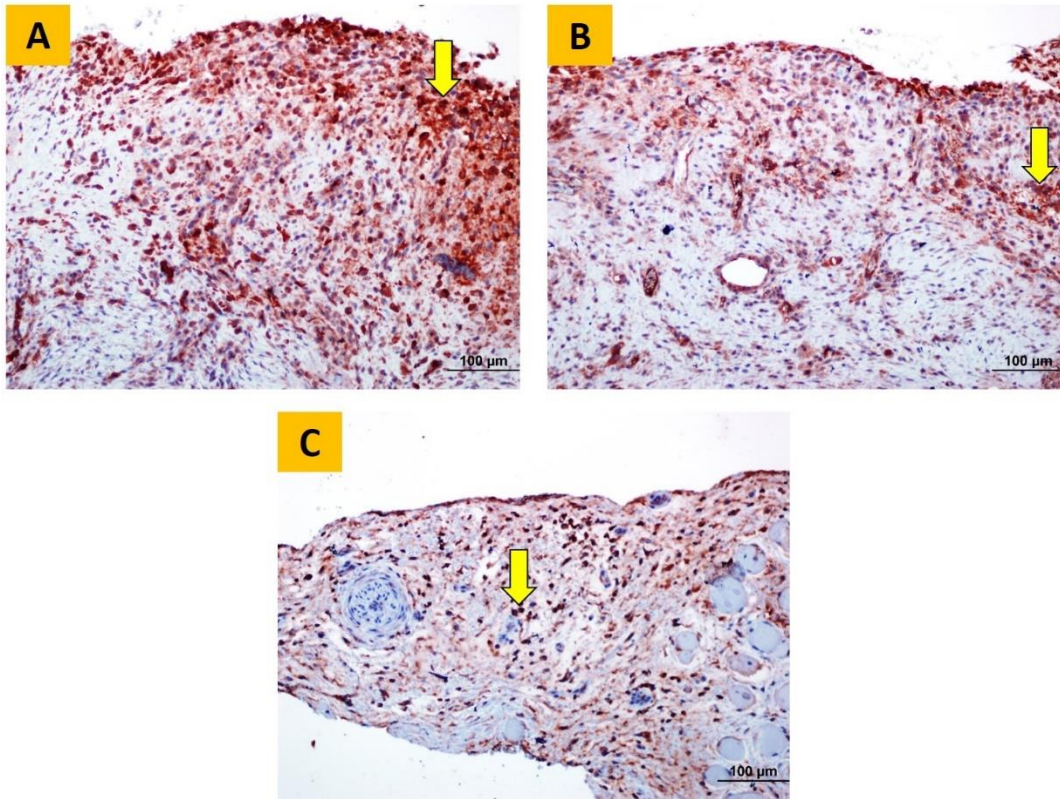
Şekil-11 - Deney gruplarına ait membran dokularının vWF ekspresyonu görüntüleri izlenmektedir. **A:** Antibiyotik uygulanmayan kontrol grubunda pozitif ve yoğun boyanma (*kalın ok*) görülmektedir. **B:** Gentamisinli çimento uygulanan grupta ekspresyonun hafifçe azaldığı (*kalın ok*) görülmektedir. **C:** Vankomisinli çimento uygulanan grupta ekspresyonun sadece kan damarlarında yoğun olduğu (*kalın ok*) izlenmektedir. Tüm barlar 100 µm'dir.



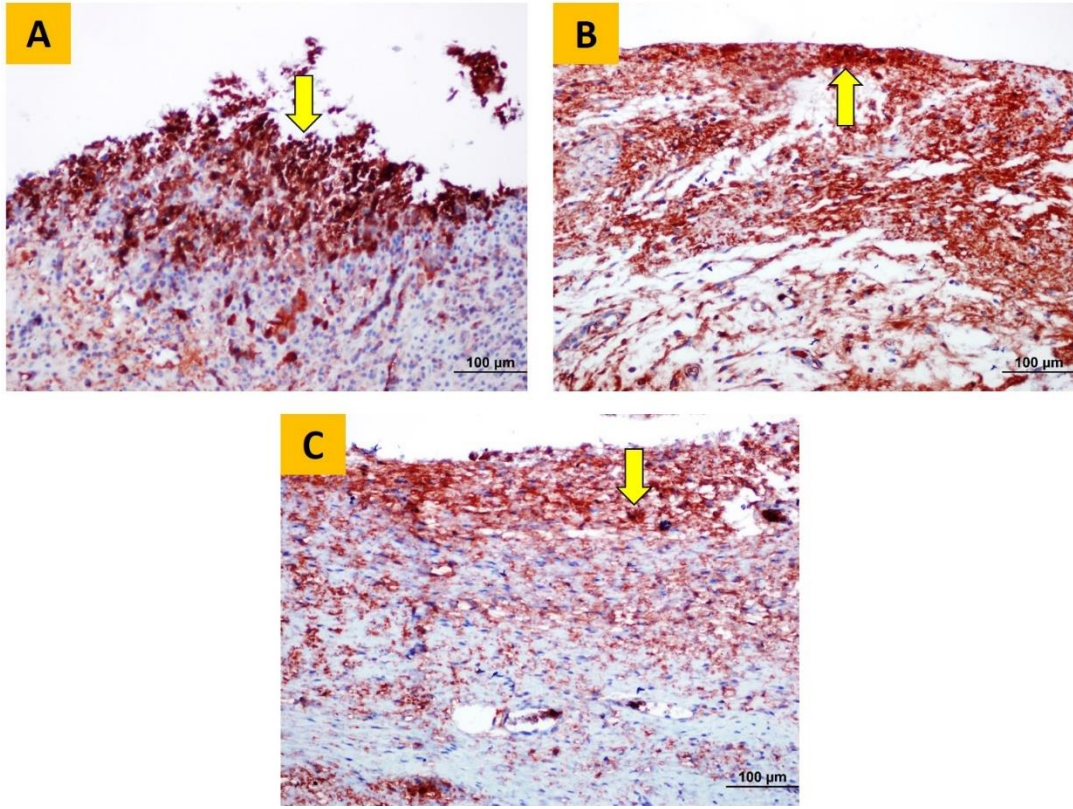
Şekil-12- Deney gruplarına ait membran dokularının VEGF ekspresyonu görüntüleri izlenmektedir. **A:** Antibiyotik uygulanmayan kontrol grubunda pozitif ve yoğun boyanma (*kalın ok*) görülmektedir. **B:** Gentamisinli çimento uygulanan grupta ekspresyonun membran yüzeyinde hafifçe azaldığı, ancak kan damarlarında yoğun olduğu (*kalın ok*) görülmektedir. **C:** Vankomisinli çimento uygulanan grupta ekspresyonun iyice azaldığı, ancak kan damarlarında yoğun olduğu (*kalın ok*) izlenmektedir. Tüm barlar 100 µm'dir.



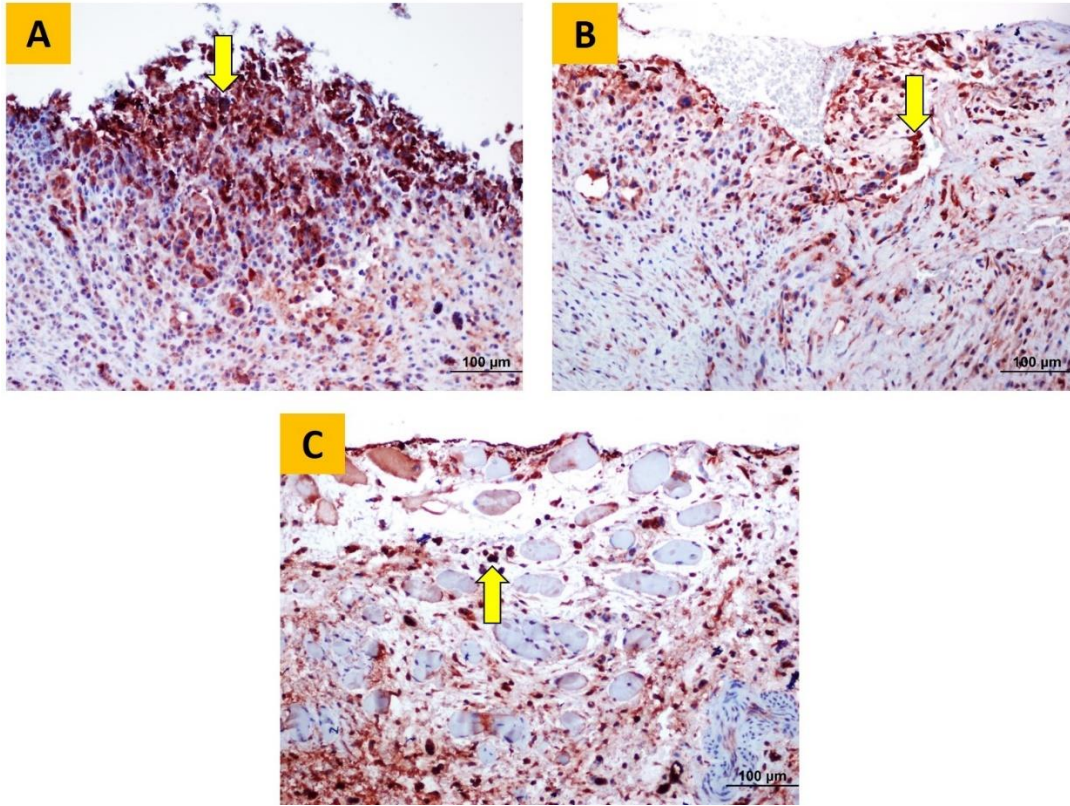
Şekil-13- Deney gruplarına ait membran dokularının TGF- β ekspresyonu görüntüleri izlenmektedir. **A:** Antibiyotik uygulanmayan kontrol grubunda pozitif ve yoğun boyanma (*kalın ok*) görülmektedir. **B:** Gentamisinli çimento uygulanan grupta ekspresyonun azaldığı (*kalın ok*) görülmektedir. **C:** Vankomisinli çimento uygulanan grupta da ekspresyonun azaldığı (*kalın ok*) izlenmektedir. Tüm barlar 100 μm 'dir.



Şekil-14- Deney gruplarına ait membran dokularının BMP-2 ekspresyonu görüntüleri izlenmektedir. **A:** Antibiyotik uygulanmayan kontrol grubunda pozitif ve yoğun boyanma (*kalın ok*) görülmektedir. **B:** Gentamisinli çimento uygulanan grupta ekspresyonun hafifçe azaldığı (*kalın ok*) görülmektedir. **C:** Vankomisinli çimento uygulanan grupta da ekspresyonun azaldığı (*kalın ok*) izlenmektedir. Tüm barlar 100 µm'dir.



Şekil-15 - Deney gruplarına ait membran dokularının IL-6 ekspresyonu görüntüleri izlenmektedir. **A:** Antibiyotik uygulanmayan kontrol grubunda pozitif ve yoğun boyanma (*kalın ok*) görülmektedir. **B:** Gentamisinli çimento uygulanan grupta ekspresyon benzer olsa da boyanma yoğunluğunun azaldığı, ancak yer yer yoğun boyanmanın olduğu (*kalın ok*) görülmektedir. **C:** Vankomisinli çimento uygulanan grupta da ekspresyonun azaldığı, ancak yoğun boyanan alanların da (*kalın ok*) var olduğu izlenmektedir. Tüm barlar 100 µm'dir.



Şekil-16- Deneş gruplarına ait membran dokularının IL-8 ekspresyonu görüntüleri izlenmektedir. **A:** Antibiyotik uygulanmayan kontrol grubunda pozitif ve yoğun boyanma alanı (*kalın ok*) görölmektedir. **B:** Gentamisinli çimento uygulanan grupta ekspresyon benzer olsa da boyanma yoğunluğunun azaldığı, ancak yer yer yoğun boyanmanın olduğu (*kalın ok*) görölmektedir. **C:** Vankomisinli çimento uygulanan grupta da ekspresyonun azaldığı, ancak yoğun boyanan alanların da (*kalın ok*) var olduğu izlenmektedir. Tüm barlar 100 µm'dir.

5. TARTIŞMA

Çalışmamız, indüklenmiş membran metodunun 1. aşamasında kullanılan çimentonun içerisine antibiyotik eklenerek, tavşan femurları üzerinde gerçekleştirildi. Amacımız antibiyotikli ve antibiyotiksiz çimentoların membran üzerine olan etkilerini göstermekti. Deney tavşanları 6 hafta takip edildi, sonrasında oluşan indüklenmiş membran histolojik ve immunohistokimyasal yöntemlerle incelendi.

Literatürde benzer nitelikte olan çok az örnek mevcuttur. Bunları kısaca gözden geçirecek olursak;

Nau ve arkadaşlarının rat femurları üzerinde yaptığı bir çalışmada 72 adet yetişkin ratın femurunda 1 santimetre boyutunda defekt meydana getirilmiş, bu kemik defektler plak ile fikse edilmiş ve defekt bölgesine palacos + gentamisin, copal + gentamisin+vankomisin, copal+ gentamisin +klinamisin içerikli çimento uygulanmış, ardından çimento üzerinde meydana gelen indüklenmiş membran 2, 4 ve 6. haftalarda örnek alınarak vaskülerizasyon, proliferasyon, membran kalınlıkları açısından analiz edilmiş. Membran kalınlığı palacos grubunda 2 haftadan 6 haftaya doğru artarken copal grubunda bu kalınlığın azaldığı görülmüş. Vaskülerizasyonun 2 haftadan 6 haftaya doğru palacos+ gentamisin ve copal + gentamisin + vankomisin grubunda arttığı görülürken, copal + gentamisin + klindamisin grubunda belirli bir değişiklik izlenmemiş(56).

Rathbone ve arkadaşları, hücre kültürleri üzerinde yapmış olduğu in vitro bir çalışmada vankomisin ve gentamisin antibiyotiklerinin hücreler üzerinde toksik etki yaptığını göstermiştir(67).

Tao Li ve arkadaşlarının yapmış olduğu başka bir çalışmada çimento içerisine 2 gram vankomisin ve 2 gram gentamisin eklenerek hücre sitotoksitesine bakılmış ve kontrol grubuyla fark olmadığı gösterilmiştir(68). Literatürde sitotoksik etkiyle ilgili olarak farklı neticeler bildiren çalışmalar da mevcuttur.

Çalışmamızda 27 adet tavşan kullanılmış ve bu tavşanlar 3 gruba ayrılmıştır. Antibiyotiksiz, vankomisin, gentamisin grubu şeklinde yapılan bu ayırmada her femurda 2 santimlik defekt meydana getirilmiş ve oluşan defektlere çimento uygulanmıştır.

Araştırmamızda elde ettiğimiz sonuçlar değerlendirildiğinde, antibiyotikli çimento uygulanan grupta membran kalite parametresi olarak belirlediğimiz değerlerin BMP-2 ve IL-8 değerleri haricinde anlamlı olarak düştüğü görülmüştür. Bunun nedeni olarak vankomisin ve gentamisinin sitotoksik etki yaptığı düşünülebilir. Membran kalite belirteçlerinden VEGF ve VWF değerleri gentamisin grubunda vankomisin grubuna göre daha yüksek çıkmıştır. TGF- β değeri açısından ise vankomisin ve gentamisin grupları arasında fark bulunamamıştır. Bu durum çimento-antibiyotik salınım dinamikleri ve inflamatuvar sitokinlerin salınımlarındaki pik dönemleriyle ilişkili olabilir. Araştırmamızda 6 hafta neticesinde oluşmuş membranlar incelendi. İlerleyen dönemde farklı haftalarda membranlardan alınan örnekler kıyaslanarak yapılacak bir çalışma yukarıda bahsedilen ilişkiye ışık tutabilir.

Çalışmada kullanılan antibiyotikler olan vankomisin ve gentamisin haricinde ısıya dayanıklılık özelliği bulunan tobramisin, eritromisin, kolistin, tetrasiklin, klindamisin gibi antibiyotikler ile çalışmada bulunan gruplar arttırılarak antibiyotik ve membran kalitesi arasındaki ilişkiye dair daha fazla fikir edinilebilir(69).

Bu çalışmada membran kalite ölçütü olarak belirlenen parametreler dışında gelecekte yapılacak çalışmalarda hücre proliferasyon markerı olarak KI-67 (56), osteoblast öncü hücrelerinde bulunan ve aynı zamanda periost markerı olarak kullanılan DDR-2 (diskoidin domain reseptörü-2) kalite parametresi olarak kullanılabilir(70).

Antibiyotikli çimento kullanılan enfekte olgular literatürde mevcuttur. Bu olgularda kaynama yüzdeleri yüksek olarak bildirilmiştir (90% Norris, 91% Donegan, 100% Man Wong). İndüklenmiş membran tekniğinde antibiyotikli veya antibiyotiksiz sement kullanılan olgularda kaynama zamanıyla ilgili olarak 4 aydan 14 aya varan

süreler literatürde mevcuttur. Bu noktada membran kalitesinin klinik sonuç üzerine olan etkileri bir tartışma konusu olabilir(3,71,72,73,74).

İlerleyen dönemde tavşanlar üzerinde indüklenmiş membran tekniğinin 1. ve 2. Aşaması gerçekleştirilerek antibiyotikli çimento, membran kalitesi ve klinik sonuçların ilişkisi açısından daha objektif neticelere ulaşılabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız çimento içerisine eklenen antibiyotiklerin membran üzerinde olumsuz etkiler oluşturduğunu göstermiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara dayanarak aseptik kaynamalarda antibiyotiksiz çimento kullanmak daha doğru bir seçim olacaktır. Ancak çimento üzerinde yapılan bu değişikliklerin membran üzerine olan etkilerini anlamak için daha çok veriye ihtiyaç bulunmaktadır. Gelecekteki çalışmalarda çimento içerisine eklenecek maddelerle, tekniğin aşamaları arasındaki zamanı kısaltmaya odaklanılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Toth Z, Roi M, Evans E, Watson JT, Nicolaou D, McBride-Gagy S. Masquelet technique: effects of spacer material and micro-topography on factor expression and bone regeneration. *Annals of biomedical engineering*. 2019;47(1):174-89.
2. Fariña R, Alister JP, Uribe F, Olate S, Arriagada A. Indications of free grafts in mandibular reconstruction, after removing benign tumors: Treatment algorithm. *Plastic and Reconstructive Surgery Global Open*. 2016;4(8).
3. Karger C, Kishi T, Schneider L, Fitoussi F, Masquelet A-C. Treatment of posttraumatic bone defects by the induced membrane technique. *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research*. 2012;98(1):97-102.
4. Masquelet A, Kanakaris NK, Obert L, Stafford P, Giannoudis PV. Bone repair using the masquelet technique. *JBJS*. 2019;101(11):1024-36.
5. Wang X, Luo F, Huang K, Xie Z. Induced membrane technique for the treatment of bone defects due to post-traumatic osteomyelitis. *Bone & joint research*. 2016;5(3):101-5.
6. Nau C, Seebach C, Trumm A, Schaible A, Konradowitz K, Meier S, et al. Alteration of Masquelet's induced membrane characteristics by different kinds of antibiotic enriched bone cement in a critical size defect model in the rat's femur. *Injury*. 2016;47(2):325-34.
7. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011;42(6):551-5.
8. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A. Platelet-rich plasma for bone healing and regeneration. *Expert opinion on biological therapy*. 2016;16(2):213-32.
9. Jahagirdar R, Scammell BE. Principles of fracture healing and disorders of bone union. *Surgery (Oxford)*. 2009;27(2):63-9.

10. Green DP. Rockwood and Green's fractures in adults: Lippincott Williams & Wilkins; 2010.
11. Krassas G, Papadopoulou P. Oestrogen action on bone cells. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*. 2001;2(2):143-52.
12. Schlickewei CW, Kleinertz H, Thiesen DM, Mader K, Priemel M, Frosch K-H, et al. Current and Future Concepts for the Treatment of Impaired Fracture Healing. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(22):5805.
13. Pereira M, Petretto E, Gordon S, Bassett JD, Williams GR, Behmoaras J. Common signalling pathways in macrophage and osteoclast multinucleation. *Journal of Cell Science*. 2018;131(11).
14. Nyary T, Scammell BE. Principles of bone and joint injuries and their healing. *Surgery (Oxford)*. 2018;36(1):7-14.
15. Chen Y, Wang W, Ding S, Wang X, Chen Q, Li X. A multi-layered poroelastic slab model under cyclic loading for a single osteon. *Biomedical engineering online*. 2018;17(1):97.
16. Cross III WW, Swiontkowski MF. Treatment principles in the management of open fractures. *Indian journal of orthopaedics*. 2008;42(4):377.
17. Trueta J. The treatment of war fractures by the closed method. SAGE Publications; 1939.
18. Carver DC, Kuehn SB, Weinlein JC. Role of systemic and local antibiotics in the treatment of open fractures. *Orthopedic Clinics*. 2017;48(2):137-53.
19. Karladani A, Granhed H, Kärrholm J, Styf J. The influence of fracture etiology and type
20. Roberts CS, Adams EL. The classification of open fractures: Are we there yet? *Injury*. 2013;44(4):403-5.
21. Oestern H-J, Tscherne H. Pathophysiology and classification of soft tissue injuries associated with fractures. *Fractures with soft tissue injuries: Springer*; 1984. p. 1-9.

22. Gustilo RB, Mendoza RM, Williams DN. Problems in the management of type III (severe) open fractures: a new classification of type III open fractures. *The Journal of trauma*. 1984;24(8):742-6.
23. Moroz PJ, Malima AK. *Common Paediatric Orthopaedic Diseases*.
24. Court-Brown CM, Bugler KE, Clement ND, Duckworth AD, McQueen MM. The epidemiology of open fractures in adults. A 15-year review. *Injury*. 2012;43(6):891-7.
25. Patzakis MJ, HARVEY JR JP, Ivler D. The role of antibiotics in the management of open fractures. *JBJS*. 1974;56(3):532-41.
26. Lingaraj R, Santoshi JA, Devi S, Najimudeen S, Gnanadoss JJ, Kanagasabai R, et al. Predebridement wound culture in open fractures does not predict postoperative wound infection: A pilot study. *Journal of natural science, biology, and medicine*. 2015;6(Suppl 1):S63.
27. Otchwemah R, Grams V, Tjardes T, Shafizadeh S, Bähris H, Maegele M, et al. Bacterial contamination of open fractures—pathogens, antibiotic resistances and therapeutic regimes in four hospitals of the trauma network Cologne, Germany. *Injury*. 2015;46:S104-S8.
28. Reichert JC, Saifzadeh S, Wullschleger ME, Epari DR, Schütz MA, Duda GN, et al. The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. *Biomaterials*. 2009;30(12):2149-63.
29. Demirtaş AM, Kırçıl C. Kaynamalarda serbest vaskülarize fibula grefti ile rekonstrüksiyon.
30. Wang W, Yeung KW. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioactive materials*. 2017;2(4):224-47.
31. Henkel J, Woodruff MA, Epari DR, Steck R, Glatt V, Dickinson IC, et al. Bone regeneration based on tissue engineering conceptions—a 21st century perspective. *Bone research*. 2013;1(1):216-48.

32. Gubin AV, Borzunov DY, Malkova TA. The Ilizarov paradigm: thirty years with the Ilizarov method, current concerns and future research. *International orthopaedics*. 2013;37(8):1533-9.
33. Spiegelberg B, Parratt T, Dheerendra S, Khan W, Jennings R, Marsh D. Ilizarov principles of deformity correction. *The annals of the royal college of surgeons of England*. 2010;92(2):101-5.
34. Solomin L. *The basic principles of external skeletal fixation using the Ilizarov and other devices*: Springer Science & Business Media; 2013.
35. BUNCKE HJ, FURNAS DW, GORDON L, ACHAUER BM. Free osteocutaneous flap from a rib to the tibia. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1977;59(6):799-805.
36. Wang P, Wu Y, Rui Y, Wang J, Liu J, Ma Y. Masquelet technique for reconstructing bone defects in open lower limb fracture: analysis of the relationship between bone defect and bone graft. *Injury*. 2020.
37. Stella M, Santolini E, Autuori A, Felli L, Santolini F. Masquelet technique to treat a septic nonunion after nailing of a femoral open fracture. *Injury*. 2018;49:S29-S33.
38. Klaue K, Knothe U, Anton C, Pfluger DH, Stoddart M, Masquelet AC, et al. Bone regeneration in long-bone defects: tissue compartmentalisation? In vivo study on bone defects in sheep. *Injury*. 2009;40:S95-S102.
39. Pelissier P, Masquelet A, Bareille R, Pelissier SM, Amedee J. Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and could stimulate bone regeneration. *Journal of orthopaedic research*. 2004;22(1):73-9.
40. Giannoudis PV, Faour O, Goff T, Kanakaris N, Dimitriou R. Masquelet technique for the treatment of bone defects: tips-tricks and future directions. *Injury*. 2011;42(6):591-8.

41. Ronga M, Ferraro S, Fagetti A, Cherubino M, Valdatta L, Cherubino P. Masquelet technique for the treatment of a severe acute tibial bone loss. *Injury*. 2014;45:S111-S5.
42. Stafford PR, Norris BL. Reamer-irrigator-aspirator bone graft and bi Masquelet technique for segmental bone defect nonunions: a review of 25 cases. *Injury*. 2010;41:S72-S7.
43. Olesen UK, Eckardt H, Bosemark P, Paulsen AW, Dahl B, Hede A. The Masquelet technique of induced membrane for healing of bone defects. A review of 8 cases. *Injury*. 2015;46:S44-S7.
44. Micev AJ, Kalainov DM, Soneru AP. Masquelet technique for treatment of segmental bone loss in the upper extremity. *The Journal of Hand Surgery*. 2015;40(3):593-8.
45. Christou C, Oliver RA, Yu Y, Walsh WR. The Masquelet technique for membrane induction and the healing of ovine critical sized segmental defects. *PLoS One*. 2014;9(12):e114122.
46. Cuthbert RJ, Churchman SM, Tan HB, McGonagle D, Jones E, Giannoudis PV. Induced periosteum a complex cellular scaffold for the treatment of large bone defects. *Bone*. 2013;57(2):484-92.
47. MAGGS, Joanna; WILSON, Matthew. The relative merits of cemented and uncemented prostheses in total hip arthroplasty. *Indian journal of orthopaedics*, 2017, 51: 377-385.
48. Jaeblo, T. (2010). Polymethylmethacrylate: properties and contemporary uses in orthopaedics. *JAAOS-Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 18(5), 297-305.
49. Kühn K-D. Properties of Bone Cement: What is Bone Cement? In: Breusch S, Malchau H, editors. *The Well-Cemented Total Hip Arthroplasty: Theory and Practice*. Germany: Springer Science & Business Media; 2005. pp.52–9.

50. Nottrott M. Acrylic bone cements: influence of time and environment on physical properties. *Acta Orthop Suppl* 2010;81(sup341):1–27.
51. Wiltse LL, Hall RH, Stenebjerg JC. Experimental studies regarding the possible use of self-curing acrylic in orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg Am* 1957;39- A(4):961–72.
52. Charnley J. Anchorage of the femoral head prosthesis to the shaft of the femur. *J Bone Joint Surg Br* 1960;42-B(1):28–30.
53. Griffith MJ, Seidenstein MK, Williams D, Charnley J. Eight year results of Charnley arthroplasties of the hip with special reference to the behavior of cement. *Clin Orthop Relat Res* 1978;(137):24–36.
54. Vaishya R, Chauhan M, Vaish A. Bone cement. *J Clin Orthop Trauma* 2013;4(4):157–63.
55. Gaio N, Martino A, Toth Z, Watson JT, Nicolaou D, McBride-Gagyi S. Masquelet technique: The effect of altering implant material and topography on membrane matrix composition, mechanical and barrier properties in a rat defect model. *Journal of biomechanics*. 2018;72:53-62.
56. Nau C, Seebach C, Trumm A, Schaible A, Konradowitz K, Meier S, et al. Alteration of Masquelet's induced membrane characteristics by different kinds of antibiotic enriched bone cement in a critical size defect model in the rat's femur. *Injury*. 2016;47(2):325-34.
57. Qiu X-s, Chen Y-x, Qi X-y, Shi H-f, Wang J-f, Xiong J. Outcomes of cement beads and cement spacers in the treatment of bone defects associated with post-traumatic osteomyelitis. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2017;18(1):256.

58. Shah SR, Smith BT, Tatara AM, Molina ER, Lee EJ, Piepergerdes TC, et al. Effects of local antibiotic delivery from porous space maintainers on infection clearance and induction of an osteogenic membrane in an infected bone defect. *Tissue Engineering Part A*. 2017;23(3-4):91-100.
59. Gouron R, Petit L, Boudot C, Six I, Brazier M, Kamel S, et al. Osteoclasts and their precursors are present in the induced-membrane during bone reconstruction using the Masquelet technique. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2017;11(2):382-9.
60. Wang X, Wei F, Luo F, Huang K, Xie Z. Induction of granulation tissue for the secretion of growth factors and the promotion of bone defect repair. *Journal of orthopaedic surgery and research*. 2015;10(1):1-8.
61. Jin F, Xie Y, Wang N, Qu X, Lu J, Hao Y, et al. Poor osteoinductive potential of subcutaneous bone cement-induced membranes for tissue engineered bone. *Connective Tissue Research*. 2013;54(4-5):283-9.
62. Aho O-M, Lehenkari P, Ristiniemi J, Lehtonen S, Risteli J, Leskelä H-V. The mechanism of action of induced membranes in bone repair. *JBJS*. 2013;95(7):597-604.
63. McCall TA, Brokaw DS, Jelen BA, Scheid DK, Scharfenberger AV, Maar DC, et al. Treatment of large segmental bone defects with reamer-irrigator-aspirator bone graft: technique and case series. *Orthopedic Clinics*. 2010;41(1):63-73.
64. Quintero AJ, Tarkin IS, Pape H-C. Technical tricks when using the reamer irrigator aspirator technique for autologous bone graft harvesting. *Journal of orthopaedic trauma*. 2010;24(1):42-5.
65. Cho J-W, Kim J, Cho W-T, Kim J-K, Song JH, Kim H-J, et al. Circumferential bone grafting around an absorbable gelatin sponge core reduced the amount of grafted bone in the induced membrane technique for critical-size defects of long bones. *Injury*. 2017;48(10):2292-305.

66. Giannoudis PV, Harwood PJ, Tosounidis T, Kanakaris NK. Restoration of long bone defects treated with the induced membrane technique: protocol and outcomes. *Injury*. 2016;47:S53-S61.
67. Rathbone, C. R., Cross, J. D., Brown, K. V., Murray, C. K., & Wenke, J. C. (2011). Effect of various concentrations of antibiotics on osteogenic cell viability and activity. *Journal of Orthopaedic Research*, 29(7), 1070-1074.
68. Li, T., Fu, L., Wang, J., & Shi, Z. (2019). High dose of vancomycin plus gentamicin incorporated acrylic bone cement decreased the elution of vancomycin. *Infection and Drug Resistance*, 12, 2191.
69. Randelli, P., Evola, F. R., Cabitza, P., Polli, L., Denti, M., & Vaienti, L. (2010). Prophylactic use of antibiotic-loaded bone cement in primary total knee replacement. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 18(2), 181-186.
70. Yang, H., Sun, L., Cai, W., Gu, J., Xu, D., Deb, A., & Duan, J. (2020). DDR2, a discoidin domain receptor, is a marker of periosteal osteoblast and osteoblast progenitors. *Journal of bone and mineral metabolism*.
71. Stafford, P. R., & Norris, B. L. (2010). Reamer-irrigator-aspirator bone graft and bi Masquelet technique for segmental bone defect nonunions: a review of 25 cases. *Injury*, 41, S72-S77.
72. Wong, T. M., Lau, T. W., Li, X., Fang, C., Yeung, K., & Leung, F. (2014). Masquelet technique for treatment of posttraumatic bone defects. *The Scientific World Journal*, 2014.
73. Donegan, D. J., Scolaro, J., Matuszewski, P. E., & Mehta, S. (2011). Staged bone grafting following placement of an antibiotic spacer block for the management of segmental long bone defects. *Orthopedics*, 34(11), e730-e735.

74. Apard, T., Bigorre, N., Cronier, P., Duteille, F., Bizot, P., & Massin, P. (2010). Two-stage reconstruction of post-traumatic segmental tibia bone loss with nailing. *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research*, 96(5), 549-553.

