

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA OLUŞAN KEMİK DEFEKTİNDE KALSİYUM FOSFAT
ÇİMENTOSU VE METOTREKSATIN KOLLAJEN MEMBRANLI VE
MEMBRANSIZ UYGULANMASININ DOKU İYİLEŞMESİ ÜZERİNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. ANIL SELİM UZUN

**DANIŞMAN
YRD. DOÇ.DR. ALP AKMAN**

DENİZLİ - 2012

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI**

SIÇANLARDA OLUŞAN KEMİK DEFEKTİNDE KALSİYUM FOSFAT
ÇİMENTOSU VE METOTREKSATIN KOLLAJEN MEMBRANLI VE
MEMBRANSIZ UYGULANMASININ DOKU İYİLEŞMESİ ÜZERİNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

**UZMANLIK TEZİ
DR. ANIL SELİM UZUN**


DANIŞMAN
YRD. DOÇ.DR. ALP AKMAN

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi'nin 2011TPF039 nolu kararı ile desteklenmiştir.

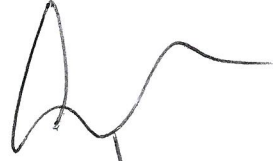
DENİZLİ - 2012

Yrd. Doç. Dr. Alp AKMAN danışmanlığında Dr. Anıl Selim UZUN tarafından yapılan “SIÇANLARDA OLUŞAN KEMİK DEFEKTİNDE KALSİYUM FOSFAT ÇİMENTOSU VE METOTREKSATIN KOLLAJEN MEMBRANLI VE MEMBRANSIZ UYGULANMASININ DOKU İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı tez çalışması 18/04/2012 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN Prof. Dr. Fahir DEMİRKAN



ÜYE Yrd. Doç. Dr. Semih AKKAYA



ÜYE Yrd. Doç. Dr. Alp AKMAN



Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

10/07/2012



Prof. Dr. Mustafa KILIÇ
Pamukkale Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakóltesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı'nda almıő olduğum uzmanlık eğitimi boyunca, eğitimimde katkıları bulunan değerli hocalarım; Prof.Dr. A. Fahir DEMİRKAN'a Prof.Dr. A.Esat KITER'e, Yrd. Doç. Dr. Murat OTO'ya ve Yrd. Doç. Dr. Semih AKKAYA'ya;

Bu çalışmanın her aőamasında bilgi ve birikimleri ile katkıda bulunan tez danıőmanım Yrd. Doç. Dr. Alp AKMAN'a

Çalıőmada bana hem klinik çalıőmaları hem de tecrübeleriyle yardımını esirgemeyen hocam Prof. Dr. A.Çevik Tufan 'a histoloji asistanlarına laboratuvar teknisyeni Erdińç Karataő' a

Rat çalışmalarında yardımcımız Barbaros őahin' e

Hayatım boyunca yanımda olup maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen anne ve babama ve eőim Ayőegöl Banu UZUN'a;

Uzmanlık eğitimim boyunca içinde bulunmakta gurur duyduğum tüm ortopedi kliniğine teőekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ONAY SAYFASI	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
SİMGELER VE KISALTMALAR	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
TABLolar DİZİNİ	VIII
ÖZET	IX
İNGİLİZCE ÖZET	X
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
Yara İyileşmesi	3
Kalsiyum Fosfat Çimentosu.....	8
Metotreksat Metabolizması	14
Seçici Geçirgen Membran.....	19
GEREÇ VE YÖNTEM	23
BULGULAR	29
TARTIŞMA	34
KAYNAKLAR	47
EKLER	

SİMGELER VE KISALTMALAR

PAÜHDEK: Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu

CPC	: Kalsiyum Fosfat Çimentosu
MTX	: Metotreksat
FGF	: Fibroblast Growth Factor
SVS	: Sentetik Vücut Sıvısı
HA	: Hidroksiapatit
TCP	: Trikalsiyum Fosfat
CDA	: Kalsiyumdan Eksik Apatit
ALP	: Alkalen Fosfataz
DHF	: Dihidrofolat
DHFR	: Dihidrofolat Redüktaz
THF	: Tetrahidrofolat
RA	: Romatoid Artrit
OCPa	: Apatitik Octakalsiyum Fosfat
PDGF	: Platelet Derivated Growth Factor
VEGF	: Vasküler Endotelyal Growth Factor
TGF	: Trombosit Growth Factor
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
mM	: milimolar
μ l	: mikrolitre
μ mol	: mikromol

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1 Yara iyileşmeleri.....	4
Şekil 2 Bone Protect Membran histolojik yapısı.....	22
Şekil 3 Bone Protect Membran.....	24
Şekil 4 Osteotomi hattı ve CPC ve Membran uygulama.....	26
Şekil 5 %2-5'lik MTX+CPC ve Membran uygulama.....	27
Şekil 6 CPC ve CPC+MTX preparatlarının histolojisi.....	28

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1 DeneY hayvanları dağılımlı.....	25
Tablo 2 Bağ dokusu için sonuçlar.....	30
Tablo 3 Kas dokusu için sonuçlar.....	31
Tablo 4 Günlere göre bağ dokusu sonuçları.....	33
Tablo 5 Günlere göre kas dokusu sonuçları.....	33

ÖZET

Sıçanlarda oluşan kemik defektinde kalsiyum fosfat çimentosu ve metotreksatın kollajen membranlı ve membransız uygulanmasının doku iyileşmesi üzerine etkisinin araştırılması

Dr. Anıl Selin UZUN

Kalsiyum fosfat çimentosu porozitesi biyolojik olarak kabul edilebilirliği, biyoindirgenmesi ve osteokondüktif özelliklerine bağlı olarak ilaç salınım sistemi taşıyıcısı olarak kemik defektlerinde kullanılmıştır. Antibiyotik yüklenmiş kalsiyum fosfat çimentoları osteomyelit tedavisinde ve önlenmesinde geniş kullanım alanı bulmuş ve kemik tümörlerinin lokal rekürresini kontrol altına almada ve kemoterapiye bağlı sistemik toksik etkilerin azaltılması amacıyla antitümör ilaçların bir taşıyıcısı olarak ta kullanılabilceği fikrini akla getirmiştir.

Metotreksat folik asidin bir analogudur. Dihidrofolat redüktaza Metotreksat bir antimetabolit olarak geri dönüşümlü olarak bağlanarak inaktive eder. Bunun neticesinde homosisteinin metionine, glisinin serine dönüşümü, timidilat ve inosilik asit sentezi bozulur ve bunun sonucunda protein sentezinde hasar oluşur. Metotreksatın ortaya çıkarttığı bu etkiler sonucunda tümör hücrelerinin etkinliği bozulur

Çalışmada 8-12 haftalık 36 adet Wistar-Albino cinsi dişi sıçan kullanıldı. Kullanılan CPC' nin sıvı ve toz fazı vardı. Sıvı toz oranı 0,4 'dü. Elli gram kalsiyum fosfat çimentosuna sırasıyla 0, 100 ve 250 mgr MTX solüsyonu eklenerek %2 ve %5'lik MTX CPC karışımları oluşturuldu. Otuz altı sıçandan rastgele 6 grup oluşturuldu. Tüm sıçanlarda kırık femurlar bir kırık boşluğu bırakılarak intramedüller k-teli ile stabilize edildi. Bu grupların üçünde kırık boşluğunu doldurmak için CPC, ikisinde ise %2 ve % 5 CPC MTX karışımı kullanıldı. Bir grupta kırık boşluğu çevresine yalnızca kollajen membran sarıldı. Kalan iki grupta %2 ve %5 CPC MTX karışımı ile boşluk doldurularak etrafı kollajen membran ile sarıldı. Bu araştırmanın ana amacı MTX'in çevre yumuşak doku üzerindeki olumsuz etkilerini araştırmaktır. CPC MTX üzerine kollejen membran uygulanması, doku iyileşmesi üzerine negatif etkileri ortadan kaldırıp, pozitif etki yaptığını bulduk. Diğer hiçbir uygulamada bu etki yoktur

Anahtar kelimeler: Kalsiyum Fosfat Çimentosu, Metotreksat, Kollagen Membran, Yumuşak doku iyileşmesi

SUMMARY

Examination of the effect of calcium phosphate cement and methotrexate with collegene membrane and without membrane application on tissue healing created on bone defects of guinea pigs.

Dr. Anıl Selin UZUN

Calcium Phosphate Cement has been used as a drug carrier in many instances depending on its biological acceptability, porosity, biosolubility and osteoconductivity. Antibiotic loaded Calcium Phosphate Cement has been largely used before for osteomyelitis prevention and treatment. As a result of its success, the idea of its use as chemotherapeutic carrier for prevention of local recurrences and for prevention of chemotherapeutic's systemic side-effects has been emerged.

Methotrexate is an analogue of folic acid. As an anti-metabolite, it's inactivates dihydrofolate reductase by reversible binding. As a result of this binding, the conversation of homocystein into methionine, the conversation of glycine into serine, the production of thymidilate and inocyclic acid is distrupted. These results in damage in the protein synthesis. The effects of methotrexate leads into distruption of tumor cell's activity.

We used 8 to 12 weeks aged 36 Wistar-Albino rats. The calcium phoshate cement that has been used is composed of powder and liquid components. The liquid-powder ratio was 0,4. 100 and 250 mgr methotrexate solutions was added to 50 gr CPC mixtures and %2 and %5 CPC-MTX mixtures had been prepared respectively. 36 rats randomly grouped into 6. In all rats, fractured femurs stabilized by intramedullary K-wires with leaving a fracture gap. In 3 of these groups, CPC is used to fill fracture gap. But in 2 group, %2 and %5 CPC-MTX mixture has been used. In one group only collagen membrane wrapped around the fracture gap. In the remaining 2 group %2 and %5 CPC-MTX mixtures used for gap filling but, they were also wrapped with collagen membrane.

The effects of methotrexate into soft-tissue healing was the main objective of the experiment. The main finding in the histological evaluation was the enhancing effect of CPC-MTX mixtures that has been wrapped with collagen membrane, in regard with soft tissue healing. This was true with %2 and %5 CPC-MTX groups, but not with the rest.

Keywords: Calcium Phosphate Cement, Methotrexate, Collagen Membrane, Soft-tissue healing

1.GİRİŞ

Tedavi amaçlı kemik rezeksiyonları sonrasında oluşan kemik defektlerine tüm dünyada sık olarak rastlanmaktadır. Günümüzde kemik defektlerinde kalsiyum fosfat çimentosu(CPC) yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Kalsiyum fosfat çimentosu porozitesi biyolojik olarak kabul edilebilirliği, biyoindirgenmesi ve osteokondüktif (1) özelliklerine bağlı olarak ilaç salınım sistemi taşıyıcısı olarak kemik defektlerinde kullanılmıştır.(2) Antibiyotik yüklenmiş kalsiyum fosfat çimentoları (CPC) osteomyelit tedavisinde ve önlenmesinde geniş kullanım alanı bulmuştur.(3) Bu uygulama CPC'lerin kemik tümörlerinin lokal rekürresini kontrol altına almada ve kemoterapiye bağlı sistemik toksik etkilerin azaltılması amacıyla antitümör ilaçların bir taşıyıcısı olarak ta kullanılabileceği fikrini akla getirmiştir. Metotreksat(MTX) CPC'nin in vitro ve in vivo çalışılardaki kinetik özellikleri CPC'nin dev hücreli tümör veya osteosarkom gibi kemik tümörlerin lokal kemoterapisinde taşıyıcı araç olarak kullanılabileceğine ışık tutmuştur.

Kemik defektlerde uygulanan kalsiyum fosfat çimentosunun destek fonksiyonu yanında iyi bir ilaç taşıyıcısı olarak ta kullanıldığı bilinmektedir. Bu amaçla antibiyotik ve antineoplastik ajanlar kalsiyum fosfat çimentosuna lokal tedavi amaçlı eklenebilmektedir. Lokal amaçlı yüksek konsantrasyonlarda kullanılan bu gibi ilaçların sistemik dolaşıma az miktarda geçmesi veya çevre yumuşak dokuya penetre olması sonucu istenmeyen sistemik ve lokal invaziv yan etkileri görülmektedir.

Bu sebeple antimetabolitik bir antineoplastik olan metotreksatın doku iyileşmesi üzerine yaptığı olumsuz etkilerinin hangi konsantrasyonlarda oluştuğu ve nasıl önlenebileceği sorusu akla gelmektedir.

Biz çalışmamızda sıçanlarda oluşturulan kemik dokuda osteotomi sonrasında kirschner teli ile fiksasyon, kalsiyum fosfat çimentosu ve değişik dozlarda metotreksat

kombinasyonunu uyguladık. Aynı zamanda kollejen membranlar kullanarak metotreksatın çevre yumuşak doku üzerindeki olumsuz etkilerini araştırdık.

Kemik defektleri sonrasında uygulanan kalsiyum fosfat çimentosu ve değişik dozlarda metotreksat kombinasyonunu ile aynı zamanda kollejen membranlar kullanarak metotreksatın (MTX) çevre yumuşak doku üzerindeki olumsuz etkilerini araştıran çalışma literatürdeki ilk çalışma olup başarı sağlandığı takdirde membran sayesinde MTX'in sistemik yan etkilerinin önlenmesinde alternatif bir yöntem olarak kullanılabilmesi ortaya çıkabilmektedir.

Birinci aşamada sıçanlara anaztezi verildikten sonra uyluk bölgeleri %10 Povidone-iodine ile silinerek steril şartlar oluşturuldu. İkinci aşamada sıçan femurlarına osteotomi uygulanarak kalsiyum fosfat çimentosu ile defekt doldurularak kirschner teli ile intramedüller fiksasyon uygulandı. Üçüncü aşamada kalsiyum fosfat çimentosu ve metotreksat kombinasyonu belirli oranlarda karıştırılarak kollejen membranlı ve membransız olarak sıçanlara uygulandı. Dördüncü aşamada belirli periyotlarda doku örnekleri alınarak histolojik takip yapıldı.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. YARA İYİLEŞMESİ

Yara iyileşmesi; travmatik bir olay sonucu organizmanın bu hasarı tamir etmesi için verdiği yanıttır. Yara iyileşmesinde ilk olarak hasar bölgesine inflamatuvar hücre infiltrasyonu, daha sonra hücre çoğalması ve matriks depolanması ve sonra da skar oluşumu olarak özetlenebilir.

Yara iyileşmesi primer, sekonder ve tersiyer iyileşme olarak üçe ayrılır. Primer iyileşme, doku kaybı mevcut olmaksızın yara kenarlarının karşılıklı bir araya getirilerek dikilmesiyle oluşan iyileşmelerdir. Sekonder iyileşme daha uzun süren bir iyileşme sürecidir ve doku kaybının olası olduğu durumlarda granülasyon dokusu oluşumu ve epitelial migrasyon ile oluşur.(4)

Tersiyer iyileşme ise gecikmiş primer kapama; ilk oluştuğu sırada çok ileri derecede kontamine olduğundan primer kapatılamayan ancak 6-7 günlük açık bırakmadan sonra iyi kanlanabilen dokularda uygulanmaktadır. Bu yöntemde, yaradaki inflamatuvar sürece, bakteri konsantrasyonunu en aza indirmek için zaman tanınmaktadır. Bütün bu işlemlerden sonra genellikle primer kapama uygulanır.

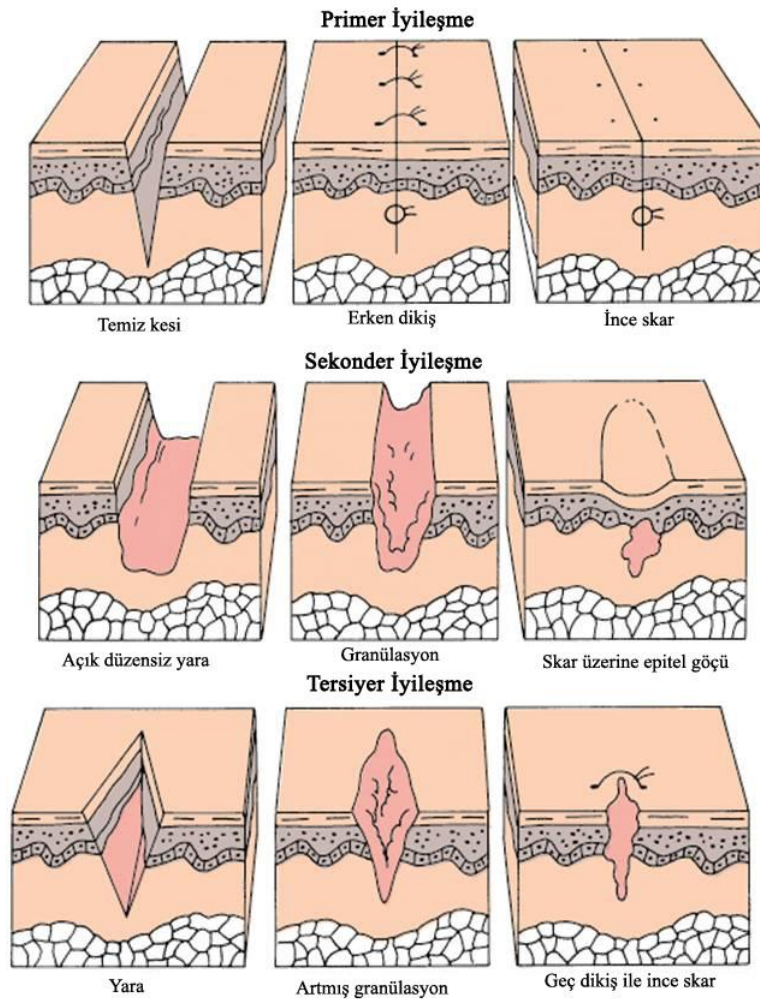
2.1.1.Faz-1: Hemostaz ve İnflamasyon

Hemostaz ve inflamasyon doku hasarına karşı verilen ilk cevaptır. İlk olarak o bölgede lokal vasküler spazm, sonrasında da vazodilatasyon olur. Kapiller geçirgenlik artar. Kapillerden sızan plazma ve protein yara alanını doldurur. Takiben yara dokusunda lökosit, eritrosit görülür.

Plazma proteinleri ve fibrinden bir sekresyonla dolar. Kan, subendotelyal kollajenlerle temas edince Hageman faktör(FXII) aktive olur, trombositler granül depolarını boşaltarak degranüle olur, serotonin gibi maddeleri açığa çıkarır ve çökerler.(4, 5)

Trombositlerden ayrıca, PAF, adenozin difosfat, tromboxanA2, trombosit kökenli büyüme faktörü serotoninde açığa çıkar. Bunlardan özellikle trombosit kökenli büyüme faktörü fibroblastlar için kemoatraktan olup, yeni kapiller damar oluşumu için uyarıcı görev yapar.

Böylece trombositler onarımı başlatacak mekanizmayı işleme sokarlar. Trombositler tarafından oluşturulan geçici pıhtı intrinsek ve ekstrinsek pıhtılaşma faktörleri protrombinin trombine ve fibrinojeni fibrine çevirmesi sonucunda stabil pıhtıya dönüşür ve hemostaz başlanır. Hemostaz inflamasyonu başlatır.(4, 5)



Şekil 1. Yara iyileşmeleri

İnflamasyon fazı, yüksek damarsal geçirgenlik, vasküler hücrelerinin yara ortamına kemotaksisi, sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin lokal salınımı ile oluşmaktadır. Fibroblastlar perivasküler bağ dokusundan kaynaklanır ve fibrin lifleri boyunca ilerleyerek yara bölgesine ulaşır. PDGF, FGF (fibroblast growth faktör) EGF (epidermal growth faktör) gibi büyüme faktörleri de fibroblast proliferasyonunda etkilidir.

Prolifere olan fibroblastlar 4–6. günlerden itibaren kollojen üretmeye başlar. Kan plazmasının eksüdasyonu sonrası yara çevresindeki hücreler çoğalır. Bunlar inflamatuvar hücreler denilen lenfositler, lökositler ile monosit ve makrofajlardır. Nötrofiller yara yerine ilk gelen hücrelerdir. Altı saat sonra yarada görülür ve üç gün boyunca bakterileri ve nekrotik dokuları fagositoz yoluyla ortamdaki uzaklaştırarak sterilizasyonunu sağlar. Ölü hücreler ve artıklar makrofajlar tarafından fagosite edilirler. İki ve üçüncü günlerde monosit yoğunluğu başlar. Fibrin azaltıcı özellikleri vardır. Üç ve beşinci günlerde makrofajlar yarada hâkim hücre olup, doku artıklarını temizlerler.

Makrofajlar fagositik hücreler olup, yara temizliği yanında proliferatif fazda granülasyon dokusunun oluşumu ve yayılması için çok sayıda sitokin de salgırlar. Monosit ve makrofajların azlığı veya kaybı fibroblast fonksiyonunda gecikme ve yetersiz anjiyogenez nedeniyle yara iyileşmesinde şiddetli değişikliğe yol açar. Çünkü makrofajlar yara tamiri nedeniyle yara iyileşmesinde şiddetli değişikliğe yol açar. Makrofajlar yara tamiri için gerekli olan tek inflamatuvar hücre tipidir.(6)

2.1.2.Faz-2: Proliferasyon ve Epitelizasyon

Bu faz; fibroplazi, granülasyon, yara kontraksiyonu ve epitelizasyonla karakterizedir. Fibroplazi safhası büyüme faktörleri ve kollojen birikimine bağlı olarak fibroblast, epitelyum ve endotel hücrelerinin artış gösterdiği safhadır. Fibroblastların ana fonksiyonu yaralanmanın ikinci gününde başlayan ve 5–7. günlerde en fazla aktivite gösteren kollojen sentezidir.

Birçok çalışmada granülasyon dokusunu ve özellikle fibroplaziyi modifiye etmek için büyüme faktörleri kullanılmıştır. PDF, TGF–alfa, keratinocyte growth factor (KGF), Vascular endothelial growth factor (VEGF) ve epidermal growth factor (EGF) adenoviral transfer topikal uygulamalar ve subkutan enjeksiyon yollarıyla granülasyon doku proliferasyonu arttırmak amacıyla kullanılmış.(4-7)

Fibroblastlar aynı zamanda proteoglikan üretirler. Bu doku makrofajlardan perisitlerden, fibroblastlardan, mast hücrelerinden meydana gelen oldukça vasküler bir yapı olup fibronektin, hiyaluronik asitten zengin preteoglikanlardan ve başlangıçta çoğunluğu tip-2 iken tip-1'e dönüşen kollojenden yapılmış bir madde içine yerleşmiştir. Granülasyon dokusu kemotaktik ve üreme faktörlerini yapı moleküllerini ve bağ dokusu elemanlarını eritebilen proteazları da içine alan farklı özelliklere sahiptir.

Makrofajlar doku debridmanına yardım eden ve kemotaktik ajanlar salgılayan önemli hücrelerdir. Makrofajların uyarısıyla çoğalan fibroblastlar hücre bölünmesi için gereken protein sentezini arttırmaları. Başlangıçta yara matriksi geçicidir ve fibrin, glikozaminoglikanlar ile hiyalüronik asitten meydana gelir. Kollajenler fibroblastların etkisiyle fibronektin ve glikozaminoglikanların üzerine depo edilir. Yara onarımının ana yapı elemanı olan dermal kollajen, fibroblastlar tarafından sentez edilir ve ekstrasellüler alana salgılanır.

2.1.3. Anjiyogenez ve Epitelizasyon

Yeni kan damarı oluşumudur ve yara iyileşmesinin sonuna kadar devam eder. Anjiyogenez olmazsa oksijen ve besin olmayacağından dolayı yara yatağına makrofaj ve fibroblastların invazyonu olmayacaktır. Yara bölgesindeki düşük oksijen basıncı, laktik asit ile trombosit ve makrofajların salgıladıkları TGF-alfa, TGF-beta, TNF gibi anjiyogenik faktörleri stimüle eder. Anjiyogenez sırasında endotel hücre göçü proliferasyon kadar önemlidir. Kemotaktik faktörler burada oldukça önemli rol oynarlar. Bu faktörler trombosit kökenli maddeler, heparin ve fibronektin olup, endotel hücre hareketini arttırır. Bu safhada endotel hücre hareketlerine yardımcı olabilecek uygun maddelere de gereksinim vardır. Bunlar da endotel hücreleri tarafından üretilen fibronektin ve kollojen gibi maddelerdir.

Kollojen sentez ve yıkımı da vasküler bazal membran oluşumunu düzenler. Literatürde anjiyogenez hakkındaki bilgiler son 20 yıl içinde hızla artmıştır. Bunun nedeni; kanser dokusunun büyümesi için de anjiyogenezin çok önemli olmasıdır. Nitekim anjiyogenezin engellendiği çalışmalarda tümör gelişiminin engellendiği gösterilmiştir. Epitelizasyon derinin alt katmanlarında bölünerek çoğalması ve granülasyon dokusunun üzerini örtmesidir. Epitelizasyon yaralanmadan 24 saat sonra başlar.

Ekstrasellüler matriks, büyüme faktörleri ve yaranın oluşturduğu elektriksel alandaki değişiklikler epitelyal hücrelerin migrasyonunda uyarıcı etki gösterirler. Yara yüzeyinin örtülmesinin tamamlanmasını takiben epidermis keratinize olmaya başlar. Keratinosit ve fibroblastlar, laminin ve tip IV kollajen salgılayarak bazal membranı oluştururlar.(4,5)

2.1.4. Faz-3: Matriks Sentezi

İkinci ve üçüncü günlerde başlayıp, 15-20. güne kadar devam eder. Bu fazın en önemli hücresi kollajendir. 18 tip kollajen vardır, yarada en çok tip-1 ve 3 bulunur. Kollajen, fibroblastlar tarafından üretilen üç uzun aminoasit zincirinden ibaret bir moleküldür. Aynı DNA'da olduğu gibi bu zincirler birbiri çevresinde dönerek bir heliks şeklinde birbirlerine bağlantılar kurarlar.(4-5)

Kollajen sentezi süresince yarada en çok bulunan ve iyileşme sürecindeki hücrelere ortam oluşturan madde glikozaminoglikanlardır. Bunları sentezleyip ortama bırakan da fibroblastlardır. Ortamdaki serbest proteinlerle birleştiklerinde proteoglikanlar olarak isimlendirilirler. Yarada en çok bulunan glikozaminoglikanlar; dermatan sülfat ve kondroitin sülfattır.

2.1.5. Faz-4: Olgunlaşma ve Yeniden Biçimlendirme

Faz 3'ün içinde kollajenin ortaya çıkması ile başlayan bir süreçtir. Yeni sentezlenen kollajen lifler düzensizdir ve çöküntüler şeklindedir. Bu liflerin düzenli bir şekilde yan yana dizilmesi sürecine “yeniden biçimlendirme” denir.(5)

Yarada oluşan yeni kollajen lifler, önce kendi aralarında kovalen bağlarla bağlanırlar. Yara çevresindeki eski kollajen liflerine bağlanma ise sonradan gerçekleşir. Nitekim bir barsak anastomozu sonrası lümen içi basıncı artarsa kaçak oluşumu, ilk 5 gün içinde anastomoz hattında, daha sonra ise dikişlerin barsak duvarından geçtiği hatta gerçekleşir. Yaranın gerginliği, sağlamlığı ve mekanik etkilere verdiği cevapta en önemli faktör; kollajen miktarı ve bunun niteliğidir. Yara iyileşmesinde elastin liflerinin sayısı ve organizasyonu hiçbir zaman yeterli olmaz. Bu nedenle, hiçbir yaralanma bölgesinde doku elastisitesi tam olarak geri dönmez.

2.2. KALSİYUM FOSFAT ÇİMENTOSU

Kemik mineralinde birbiri ile kolkola gelişen iki kalsiyum fosfat fazına rastlanmaktadır; amorf kalsiyum fosfat (8) ve apatitik kalsiyum fosfat(9). Tip 1 kollejen ile uyumlu olarak, biyoseramik nanokristalleri biçiminde kemiklerimizde oluşan apatitik kalsiyum fosfat 15 ila 60 nm boyutlarına sahiptir. Dolayısıyla bilim adamlarının ancak son 15 yıldır, nanoteknoloji diye uğrunda didindiği şey insan kemiklerinde anlık, günlük ve rutin olarak örnekleniyor ve yineleniyor. Vücutta üretilen ve kullanılan “apatitik kalsiyum fosfat” ve pek çoğumuzun bildiği ve duyduğu “kalsiyum hidroksiapatit” biyolojik, kimyasal ve fiziksel özellikleri bakımından birbirinden çok farklıdır. Osteoklast hücreleri “biyolojik kemik mineraline benzer” yüzeyleri tanıyabilme yetisine sahiptir.(10) Böyle, kemik mineraline benzer yüzeyler bulduklarında (bir başka deyişle vücuda yapay dolgu malzemelerinin yerleştirildiği durumda) onları aşındırmaya (enzimatik lisiz) başlarlar.

Yük taşıma yetisi olan metalik implant veya vidaların kemiklere sıkıca tutturulması için kullanılan akrilik çimentoları yaşayan kemik dokuları tarafından özümsememekte olup, osteokondüktif özellikten de yoksundur. Bu durum özellikle yaşlılarda sıkça rastlanan kalça protezi uygulamalarında, hastaya bazen birden fazla hatta birkaç yıl aralarla tekrar tekrar ameliyat olma sıkıntısını yaşatabilmektedir .(11)

Bırakınız özümsebilir olmayı, osteokondüktif dahi olmayan akrilik çimento türü radyoopasite sağlayıcı baryum sülfat katkılı nedeniyle sitotoksik etkilerinin olduğu kanıtlanmıştır. Yapıştırıcı ve doldurucu malzemelerin kemik dokuları ile yakın temas halinde metalik implantları sabitlemek için vücuda yerleştirilmesi, kemik dokularının canlılığı ve dolayısıyla yeniden biçimlenme(remodeling) yetisini günden güne yitiren orta yaş üzerindeki hastalarda kullanılması bu hastaların bir kısmının tekrar ameliyat alınabileceklerinin adeta garantisi olmaktadır .(12)

Kalsiyum fosfat çimentoları, ortopedik cerrahi tarafından ameliyat masasında karıştırılmak üzere hazırlanmış ve bir steril paket içinde cerraha sunulan bir özel toz ve bu tozun başlatıcı, tetikleyici çözeltilisinden oluşmaktadır. Sunulan toz ve çözeltilinin tamamı, spatül ile steril bir kap içinde 1-2 dakika karıştırıldıktan ve PMMA çimentolarının aksine çevresine ısı yaymayarak diş macunu benzeri bir kıvama

ulaştıktan sonraki 7 ile 13 dakika içinde sertleşmekte ve bünyesinde, kemik minerali olan apatitik kalsiyum fosfata oldukça benzeyen niteliklerde, kalsiyum fosfat nanokristalleri oluşturmaktadır. Üç boyutta ve hemen her boyda (tipik olarak 20 nm ile 100 nm arası) hızla gelişen bu kalsiyum fosfat nanokristallerinin birbirleri ile elin parmakları gibi kilitlenmeleri ortaya çıkan çimentoya mekanik direnç ve tokluğunu sağlamaktadır.

Osteoblast ve osteositlerin kemik mineralini (amorf kalsiyum fosfat ve apatitik kalsiyum fosfat) 37°C'de, pH değeri 7,4 olan kan içinde oluşturmaya başladıkları bilinir. Buna göre vücut ile uyumlu biyomalzeme üretmek için yola çıkanların da kendi laboratuvarlarında yapması gereken şey amorf veya apatitik kalsiyum fosfat elde etmek için biyomimetik üretim yöntemleri geliştirmek doğrultusunda araştırma çabalarını yoğunlaşması gerekmektedir.(13)

İlk kez 1996 yılında geliştirmeye başlanan 'sentetik vücut sıvısı' (SVS) formülasyonu ile apatit ve nanoparçacıklı, çok yüksek yüzey alanına (150-900 m²/g) sahip kalsiyum fosfatların 37°C ve pH 7,4'te, SVS ortamında biyomimetik üretiminin olası olabileceğini bulunmuştur.(14)

SVS ortamı nanobiyomalzeme üretim sürecindeki sıcaklığı insan vücut sıcaklığı olan 37°C'de sabit tutulabiliyor. SVS çözeltileri içinde biyomimetik kalsiyum fosfat üretimi yapılırken çözelti pH değeri de insan kanının pH değeri olan 7,4'te sabitleniyor.

Böylece, biyomimetik olarak üretilmiş kalsiyum fosfat biyomalzemeleri, ortopedik kalsiyum fosfat çimentolarında bundan sonraki araştırmalar tarafındanda kullanılacak başlıca başlangıç malzemeleri olacaktır. Üretilen ve geliştirmeye çalışılan ortopedik kalsiyum fosfat çimentolarının hepsinin en önemli ortak özelliği de, aşındırıcı kemik hücreleri olan osteoklastlar tarafından özümselebilmeleridir. Doğal kemik dokuları içine, boşluk ve defektleri ilk anda doldurmak amacıyla yerleştirildikten kısa bir süre sonra doğal kemikler ile uyum sağlamaları ve bir yıl içinde tümüyle özümseyerek yerlerini doğal kemiğe bırakmalarındır. Bir yapay kemik dolgu malzemesinden beklenen de zaten bu olmalıdır.

Hücreler tarafından tümüyle özümselemeyen ve yine hücreler tarafından üzerlerinde, yüzeylerinde biyolojik apatitik kalsiyum fosfat ve kollajen matrisi üretilmeyen, birinci kuşak malzemeler diye anılan, sinterlenmiş, kalsine edilmiş kalsiyum hidroksiapatit vb. Seramiklerin önümüzdeki onyılda kullanımına devam

edilmesi olası olmayacaktır. Bu noktada yapılan araştırma çabaları bunların yerine daha ileri kuşak malzemeleri koyabilmeye dönüktür.

Lokal ilaç iletim cihazları yan etkileri azaltır, var olan ilaçların efikasitesini artırır ve yeni tedaviler için yepyeni bir sınıflandırma açar. Bu gibi kombine sistemler ilaç salınımını taşıyıcı özelliklerinin ayarlanması ile kesin olarak kontrol edebilmektedir.(15) Sentetik polimerler taşıyıcı olarak sıklıkla kullanılmaktadır çünkü implantasyondan sonra dokuda ciddi bir inflamasyona neden olmazlar. Kemik greftinin alternatifi olarak kalsiyum fosfatların hücreler tarafından rezorbe edilebilmeleri, osteokondüktif etkilerinin kanıtlarının gösterilmesi ve ortopedi, dental ve kulak burun boğaz cerrahilerindeki yüksüz klinik koşullarda etkin bir biçimde kullanılabilmesi ile daha güvenilir olduğu düşünülmektedir.(16,17)

Sentetik kemik greftleri çoğunlukla inorganik bileşikler ve bazı durumlarda da inorganik – polimer bileşikleridir. Bu inorganik materyaller genellikle üç kimyasal aileye bölünür: kalsiyum fosfatlar, kalsiyum sülfatlar ve kalsiyum karbonatlar. Bunlar sentetik kemik greftleri için en güncel alternatifleri temsil etmektedir ve pudra, granül, seramik, sement ve örtü (coating) gibi çeşitli formlarda bulunurlar. Vertebralarda kemik dokuların mineral fazı çoğunlukla kalsiyum fosfatlardan oluşmaktadır, bu da kalsiyum fosfat materyallerinin neden kemik remodeling kinetiklerine uygun olduğunu açıklar. Diğer iki aile de novo kemik formasyonu için aşırı çözünür kabul edildikleri için çalışmalarda kalsiyum fosfat biyomateryalleri üzerine odaklanmıştır.

2.2.1.Seramikler ve Sıvı Apatitler

Bileşim temelinde sentetik kalsiyum fosfatlar genellikle kalsiyum hidroksiapatit (HA), alfa veya beta trikalsiyum fosfat (α - veya β - TCP), HA ve β - TCP karışımları için bifazik kalsiyum fosfatlar ve sıvı apatitler veya kalsiyumdan eksik apatitler (CDA) olarak sınıflandırılır. Kalsiyum fosfat biyomateryalleri çözünürlükleri açısından farklıdır, dissolüsyonun karşılaştırılabilir derecesi α -TCP \gg CDA $>$ β - TCP \gg HA şeklindedir. Bifazik kalsiyum fosfatlar için dissolüsyon derecesi β - TCP/HA oranına bağlıdır, oranın fazla olması, dissolüsyon derecesinin de daha fazla olması anlamına gelmektedir.(18, 19)

Kalsiyum fosfat seramiklerinin granül veya blok formunu mevcuttur, form seçimi doldurulacak kemik defektine bağlıdır. Makroporosite (por büyüklüğü > 80-100 µm) hücrelerin kolonize olma kapasitesi olarak tanımlanmaktadır.(20) Mikroporosite (por büyüklüğü < 10 µm) biyolojik sıvılarla dolma kapasitesi olarak tanımlanır. Katılma sürecinin bir sonucu olarak doğar ve mikroporosite temel olarak kullanılan materyal bileşimine ve termal siklusa bağlıdır. Bu kalsiyum fosfat materyallerinin çözünürlük ve biyolojik özellikleri sıkı bir biçimde kristal büyüklüğü, iyonik saf olmama durumuna, spesifik yüzey alanına ve hem makroporosite hem de mikroporositeye bağlıdır.(19,20) Tüm bu parametrelerin de biyoseramiklerin son mekanik özellikleri üzerine spesifik etkileri vardır.(21)

2.2.2. Sementler

Apatitik kalsiyum fosfat sementleri (CPC) ilk olarak LeGeros tarafından 1982'de sunulmuştur ve Brown ve Chow tarafından 1986'da ilk CPC patenti alınmıştır.(22) Kalsiyum fosfat granül veya daha önceden şekil verilmiş biyoseramiklerin aksine, CPC kemik defektinin kısa sürede şeklini almaktadır ve bu da önemli bir avantajdır. CPC hızlıca kemik yapısına entegre olur ve kemik hücrelerinin lokal kemik remodelingden sorumlu hücresel aksiyonları ile yeni kemiğe dönüştürülür.(23,24) Bu iyi özelliklere rağmen CPC'lerin zayıf mekanik özellikleri ve yavaş in vivo dejenerasyonlarından dolayı bazı limitasyonları da vardır. Şu anda piyasada bulunan CPC'lerin çoğunu implantasyondan sonra yoğun kalırlar, 3 boyutlu hücre kolonizasyonu ve doku büyümesine izin verecek makroporositeleri kısıtlıdır. Bu girişimde polisakkaridler veya rezorbabl lifler (Vicryl) içeren yeni CPC'ler dizayn edilmiştir. Bu parçacıklar veya liflerin dissolüsyonunun kemiğin içe büyümesine uygun kanallar geliştireceği düşünülmektedir, ancak mekanik özellikler şu anda optimal değildir.(25,26)

Postmenopozal osteoporoz kemik kırıkları ile klinik semptomları verir. Bu kırıklar genellikle proksimal femur ve vertebral kolonu etkiler. Osteoporotik alanların spesifik olması osteoporotik kırıkların engellenmesi için lokal bir yaklaşım olması gerektiğini desteklemektedir. Önerilen stratejilerden biri lokal olarak kalsiyum fosfat biyomateryallerinden kemik proteinlerinin in situ salınımı ile bu kemik alanlarının güçlendirilmesidir.(27-29) Bu lokal yaklaşım osteoporotik alana implante edilen

kalsiyum fosfat matriksinin zayıflamış kemiği hem mekanik olarak güçlendireceği hem de yeni kemik formasyonuna bir destek oluşturacağı için özellikle dikkat çekmektedir. HA'lar kemik proteinlerine afinitesi yeni kalsiyum fosfat sistemlerinin geliştirilmesi için kullanılmaktadır. Seshima ve ark. (30) HA'nın alendronat için olası bir vektör olabileceğini ve kristalleşme, spesifik yüzey ve kemik proteinlerin salınım profilleri üzerine çözümlüğünün etkilerini çalışmıştır. Benzer biçimde Boanini ve ark (31) %7 alendronat ile yüklenmiş HA nanokristalleri sentezlemiştir. Bu materyallerin in vitro değerlendirmesi yaklaşık %30 osteoklastlarda azalma ve osteoblastik aktivitede de artma göstermiştir, bunların özellikleri de alkalın fosfataz (ALP), osteokalsin ve tip I kollajen sentez zamanında iki katına çıkma vardır.(32).

İlginç olarak, çok az sayıda çalışma kemik proteinleri ile kalsiyum fosfat materyalleri arasındaki ilişkiyi incelemiştir. Var olanlar da genellikle HA ile ilgilidir ancak çok sayıda sentetik kalsiyum fosfatlar kemik desteği olarak kullanılmaktadır çünkü yüksek derecede fizyolojik koşullar altında stabil olan HA'nın aksine kemik defektlerine de grede edilebilir ve yeni kemik formasyonu aynı anda olur. Kalsiyum fosfatın çözümlülük ve kimyasal bileşimindeki farklılıklardan dolayı biyofosfonatlara doğru olası değişik reaktiviteler tahmin edilebilir.

Nadir olsa da (%1-2) implantasyon ya da tıbbi cihazın revizyonu ile ilişkili enfeksiyon riski neden olabileceği morbiditeden olayı istenmemektedir. En uç noktalarda akut veya kronik osteomyelit gelişimi ile hastanın vital prognozu kötüye gidebilir.(33) Antibiyotikler ile emdirilmiş HA bloklarının implantasyonunu , kalça artroplastisinden sonra enfeksiyonlar karşılaşmış yedi hastanın altısında beş yıllık monitorizasyon sonunda enfeksiyon ile teması olmamıştır.(34) Antibiyotik vektörü olarak kullanılan CPC iyi klinik sonuçlar sunmaktadır. 35.659 hastayı kapsayan 19 çalışmanın meta analizi kemik enfeksiyonlarının etkin tedavisinde yüklü sement kullanımının yararlarını desteklemiştir.(35) Kemik enfeksiyon oranlarını birincil müdahalede yarıya ve ikincil müdahalede de neredeyse %40'a düşürmektedirler. Bazı suşlarda direnç bildirilmiştir. Bu sebeple antibiyotik yüklü sementlerin rutin kullanımından kaçınmak ve sadece çoklu direnç olan suşlarda kullanımıyla sınırlamak gerekmektedir.(36)

Tüm malign tümörlerin %0.2'sini temsil etse de osteosarkom iskeletin temel malign tümörüdür. Tanı anında bulunan osteosarkom olgularının %80'i genellikle pre- ve postoperatif kemoterapi ile ve cerrahi ile tedavi edilebilir, şifa oranları %60 ila %70 arasında değişmektedir.(37) Cerrahi, %90'dan fazla hastalarda ekstremitte korunması yönündeki prosedürdür. Lokal agresif primer kemik tümörlerinin %5-10'u olan dev hücreli tümörler en sık rekürrens gösteren tümörlerdir. Bu rekürrens genellikle tümörün ilk ortaya çıktıktan sonraki iki – üç yıl içerisinde görülür.(38)Primer kemiğe lokalize tümörlerin geniş eksizyonu ve çevreleyen dokuların korunması kemoterapi ile ilişkili sistematik olmalıdır. Bu ilişki örneğin pulmoner metastazların gelişimini kemik lokalize tümürlü hastaların yarısında engeller. Kemoterapi tedavisi uygulanmadan önce, beş yıllık sağ kalım %20'yi geçmiyordu.

Bu bulgular ile karşılaşan çeşitli ekipler antikanser ilaçları kemik alanlarına salan kombine sistemlerin geliştirilmesini incelemeye başlamıştır. Kombine kalsiyum fosfat sistemlerinin amaçları tümör eksizyonu sonucunda oluşan kemik defektini kemik grefti ile doldurmak (rekonstrüktif cerrahi) ve kemoterapötik ajanların kemik alanına lokal, yüksek ve devamlı konsantrasyonlarda salınmasını sağlamaktır. Dahası, lokal salınım nedeniyle yüksek dozlarda verilen ajanlar hasta tarafından daha iyi tolere edilmektedir. Tedavilerin yan etkileri (sindirim komplikasyonları, hematotoksisite, nefrotoksisite, hepatotoksisite ve benzeri gibi) kaynaklı tedaviye ara vermeler de önemli oranda azalmaktadır.(38)

Itokazu ve ark. CPC'den MTX salınımını karakterize etmiştir. Bu kombine sistemler ilk günlerde 1 mg/ml MTX salmıştır. Bu salınım progresif olarak 12. güne kadar devam etmiştir ve 0.1– 1 µg/ml lokal konsantrasyonlarda bile etkin kalmıştır. Abe ve ark. in vivo paklitakselin kompozit materyalini (HA/alginat boncuları ile %2.4 wt paklitaksel) incelemiştir. Vertebral kolonda kemik metastazları için sıçan modeli kullanmışlardır. Tedavi edilmemiş kontrol grubuyla karşılaştırıldığında kemik metastazlarında %140 azalma bulunmuştur. Dahası, kombine sistemleri sağ kalımı %150 oranında artırmıştır. Bu kombine sistemden paklitaksel salınımı sistemik uygulamadan 30 kat daha güçlü dozlarda bile daha etkili sonuçlar ile ilişkili bulunmuştur.

2.3. METOTREKSAT'IN METABOLİZMASI

Metotreksat folik asidin bir analogudur. Dihidrofolat redüktaz enzimi sayesinde folik asit, dihidrofolat(DHF) ve tetrahidrofolata indirgenir. Bu indirgenen folatlar, homosisteinin metionine dönüşümü sırasında, histidin metabolizmasında, DNA sentezi için gerekli olan timidilat sentezinde ve purin sentezi rol alırlar. Dihidrofolat redüktaza (DHFR) Metotreksat bir antimetabolit olarak geri dönüşümlü olarak bağlanarak inaktive eder. Bunun neticesinde homosisteinin metionine, glisinin serine dönüşümü, timidilat ve inosilik asit sentezi bozulur ve bunun sonucunda protein sentezi hasar oluşur. Metotreksatın ortaya çıkarttığı bu etkiler sonucunda tümör hücrelerinin ve romatolojik hastalıklarda etkinliği olan inflamatuvar hücrelerin etkinliği bozulur.(39)

Folatın hücre içerisine aktif transportu sırasında MTX folat ile yarışarak hücre içerisine folat yerine kendisi girer. Başlıca karaciğerde diğer folatlar gibi MTX'de poliglutaminasyona uğrar. Poliglutamat yapı muhtemelen tüm hücrelerde bulunur, poliglutamat formunun eritrosit, karaciğer, fibroblastlar ve kemik iliği myeloid serisinde ölçümleri yapılmıştır. MTX poliglutamatları hücre içinde tutulur ve DHFR enzimine bağlanarak DHF ile yer değiştirir (40,41). Bu işlem sonrasında MTX hücre içerisinde uzun süre kalabilir. MTX'in bu formundan tekrar eski formuna hidrolitik enzimler ile getirildiği için genelde haftalık tez doz kullanımı yeterli olmaktadır.

Gastrointestinal sistemde MTX'in emilimi doza bağımlı olup gıdalarla etkileşimi üzerine çelişkili çalışmalar mevcuttur. Serum pik seviyesine emiliminden 1-2 saat sonrasında ulaşır. Romatolojik olgularda genel kullanım dozu 10 mg/m²/hafta iken kanser tedavisinde kullanımı kanserin çeşidine ve uygulanan kombine tedaviye bağlı olarak değişmektedir. Yaklaşık biyoyararlanımı %60 civarındadır. Doz arttırıldığında intestinal flora tarafından metabolize edilerek atılımının sağlanması nedeniyle emilimi azalır. Emilen MTX'in %50'si serum proteinlerine bağlanır ve diğer bağlanan maddeler ile yarışır. Başlıca vücuttan uzaklaştırılması böbreklerde glomeruler filtrasyon ve tübüler sekresyonla olurken az bir kısmı safra ile atılır. Plazma yarılanma ömrü yaklaşık 6 saattir ve birçok ilaç MTX ile etileşebilmekte ve emilimini, yapısını ve atılımını etkileyebilmektedir. Diğer antifolat ilaçlarla alındığında folat yetmezliğine neden olur. Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlarla alındığında böbrek atılımı yönünde olumsuz etkileri oluşmaktadır.(39)

Yapılan geniş çaplı araştırmalara rağmen MTX'in etki mekanizması halen tam olarak anlaşılamamıştır. Metotreksat bir folik asit antagonisti olup pürin metabolizmasında dahil olduğu folik aside bağımlılık gösteren bir çok metabolik yolu birkaç mekanizma ile inhibe edebilmektedir. Bu mekanizmalar arasında en önemlisi dihidrofolat redüktaz enziminin inhibisyonu ile folik asidin dihidro ve tetrahidrofolata indirgenmesinin önlenmesidir. MTX'in poliglutemil deriveleri sadece metotreksattan daha güçlü inhibitör değil, aynı zamanda folik asit metabolizmasında rol oynayan diğer alt basamak enzimleride inhibe etmektedir. Metotreksatın antiproliferatif ve antiromatizmal etkilerinin folik asit metabolizmasındaki proksimal enzimlerden ziyade distal enzimler olan timidilat sentetaz ve aminoimidazol-korboksiamidriboditranforaminaz enzimlerinin inhibisyonu ile ortaya çıktığı öngörülmektedir. Bu enzimler pürin ve pirimidin sentezi için gerekli olan enzimlerdir. Pürin nükleositlerinin ve sonuç olarak DNA ve RNA sentezi için bu enzimler gereklidir.

2.3.1. Folat Antagonisti Olarak MTX'in Mekanizması

İnsanlarda vücudun ana yapılarından folatı sentezleme özelliği olmadığından dietle folat alımı zorunludur. DHFR, DHF'yi folat bağımlı yollarda temel bileşen olarak hizmet eden THF'ye dönüştürür. Chabner ve ark. MTX'in folat antagonisti mekanizması olarak iki teoriyi öne sürmüşlerdir (42).

A) Folatın azalma teorisi, intrasellüler folatın azalması DHFR'nin blokajına dayanmaktadır (42).

B) Yarışma teorisi, nükleotidlerin sentezinde görevli basamakları MTX'in doğrudan inhibe etmesine ve DHF birikimine dayanmaktadır (42).

MTX, DHFR'ı inhibe eder bu yüzden tetrahidrofolatın (THF) azalmasına neden olur. MTX poliglutamaları 5,10 metilen THF redüktaz, glisinamid ribozil 5 fosfat (GAR) formiltransferaz ve aminoimidazol karboksamid ribozil 5 fosfat (AICAR) formiltransferaz enzimlerini doğrudan inhibe eder.

Bu enzimlerdeki inhibisyon pürin ve primidin metabolizmasında inhibisyonla sonuçlanır.(40) Takiben DNA ve RNA sentezini inhibe eder. 5-metil THF'in azalması homosisteinin remilasyonunda azalmaya ve homosistein ile adenzin düzeylerinde artmaya neden olur. MTX, SAM miktarındaki azalmaya ek olarak doğrudan metionin

sentetazı ve metionin transportunu inhibe edebilir (43). Transmetilasyonun azalmasını takiben poliaminlerin sentezini de azaltır (40).

2.3.2. Metotreksatın Antiproliferatif Etkisi

MTX, kanser tedavisi için yüksek dozlarda antiproliferatif etkisi için kullanılır (40, 44). Bunun haricinde, düşük doz olarak Romatoid artrit (RA) kullanılır. Ancak RA tedavisinde MTX'in mekanizması antiproliferatif etki ile açıklanamaz.

Hirata'nın yaptığı çalışmalarda çıkan sonuçlar düşük dozlarda MTX uygulanarak RA'de endotel hücre proliferasyonunun doğrudan inhibe edildiği görüşünde olmakla birlikte yine farklı bazı çalışmalarda lenfosit proliferasyonunun inhibisyonu hakkında zıt görüşler ortaya çıkmaktadır. (40,45)

2.3.3. Metotreksatın immünomodülatör Etkisi

İmmün mekanizmalar RA'nın patogeneğinde önemli rol oynarlar. B ve T hücrelerindeki aktivite artışının MTX ile baskılandığı gösterilmiştir. RA'lı hastaların idrar, sinovyal sıvı ve lenfositlerinde poliamin seviyeleri yüksek bulunduğu için poliaminler RA'nın patogeneğinde rolü olabileceği düşünülmektedir.

Poliaminlerin hücre proliferasyonu, farklılaşması ve immün yanıtta önemli görevleri vardır.(46) MTX'in immünomodülatör etkisi poliaminlerin sentezindeki inhibisyon ile ilişkili olabilir. (40, 46)

2.3.4. Metotreksatın Antiinflamatuvar Etkisi

Metotreksat, RA'da ve psöriatik artrit tedavisinde antiinflamatuvar etkisi nedeniyle kullanılmaktadır. TNF-alfa, interlökin 1 gibi sitokinler ile metalloproteinazlar gibi inflamasyonun mediatörlerinin RA'da MTX tedavisi ile azaldığı gösterilmiştir. (47) Cronstein, MTX'in iki biyokimyasal mekanizma ile antiinflamatuvar etkide rolünün olduğunu öne sürmüştür. (48)

1) Homosisteinin yeniden metilasyonunun inhibisyonu(48).

2) Adenozin salınması. in vitro çalışmalarda fibroblastlarda ve endotel hücrelerinde düşük doz MTX'in adenozin salınımına yol açtığı gösterilmiştir Adenozin antiinflamatuvar etkide merkezi rolü vardır. (48)

2.3.5. MTX'in Yan Etkileri

MTX tedavisi esnasında ortaya çıkan yan etkiler oldukça yaygındır. Yan etkinin şiddeti değişiktir. En sık rastlanan yan etkiler hafif ve geri dönüşümlüdür. Bulantı, kusma, transaminazlarda yükselme ve stomatit gibi yan etkiler sıklıkla dozla ilişkilidir. MTX tedavisi alan RA'lı hastaların yaklaşık %30'unda ilaç toksisitesi nedeniyle tedavi kesilir (40).

MTX toksisitesinin mekanizması hala tam anlaşılmamıştır. Ancak bazı yan etkiler bahsedilen pürin, pirimidin, poliamin ve folat gibi metabolik yolların bozuklukları ile doğrudan ilişkilendirilmiştir. Kremer ve ark. ilk kez RA'lı hastaların karaciğer biyopsisinde MTX poliglutamatlarının birikmesine folat eksikliğinin eşlik ettiğini göstermiştir. (49) Değişik yollarda adenozin deaminazın (ADA) MTX tarafından inhibisyonu deoksiadenozin ve deoksiadenozin trifosfat (dATP) gibi adenozin metabolitlerinin birikimine yol açar. Adenozin, deoksiadenozin ve metilli adenozin metabolitleri yüksek konsantrasyonlarda muhtemelen doğrudan toksik etkilidirler.

Deoksiadenozin kromozom kırıklarına ve S-adenozil homosistein (SAH) hidrolaz enziminde inaktivasyona yol açar. SAH-hidrolaz metilasyon reaksiyonları için gereklidir. dATP DNA sentezi için gerekli olan ribonükleotid redüktazı inhibe eder.(40) Baggott ve ark. MTX tedavisi ile ADA inhibisyonu geliştiğini destekleyen veriler elde etmişlerdir. (50)

MTX'in vasküler hastalık için risk faktörü olarak bilinen hiperhomosisteinemiye sebep olduğu bilinmektedir. (40, 47) Metilasyon reaksiyonlarının belirleyicisi olan SAM/SAH oranında azalmaya neden olur. Metilasyon reaksiyonlarının inhibisyonu toksisiteye neden olabilir.(40) Son bir çalışmada metionin metabolizmasında polimorfizm ile lökoensefalopati arasında ilişki kurulmuştur.(42)

2.3.5.1. Gastrointestinal Sistem Yan Etkileri

İştahsızlık, mide bulantısı, kusma, ishal, kilo kaybı gibi yan etkiler sıktır. Hastaların büyük kısmında hafif seyreder ve kısa sürer. Ancak %2,5 hastada ilacı kesecek şiddette olabilir. Yine çeşitli şiddette ağrılı ülser ve eritemden oluşan stomatit

görülebılır. Gastrointestinal yan etkileri düzenli verilecek folik asit takviyesi, dozun azaltılması veya parenteral uygulamaya geçilmesiyle azaltılabilir. (51, 53, 54)

2.3.5.2.Kutanöz Yan Etkiler

Alopesi, güneş ışığına hassasiyet, eritem, ürtiker ve kutanoz vaskülit olabilir. Ayrıca romatoid nodullerin sayısında artış olabilir. (51, 54)

2.3.5.3.Hematolojik Yan Etkiler

Yeterli folik asit desteği verilmeksizin uzun süre metotreksat kullanımı folat eksikliğine ve eritrositlerde makrositoza neden olabilir. Lökopeni, trombositopeni, megaloblastik anemi ve pansitopeni nadirdir ve %5'ten az görülür. Renal yetmezlik, folik asit eksikliği, akut viral enfeksiyonlar, birlikte probenesisid, trimetoprim-sulfometaksazol gibi ilaçların kullanımı riski arttırır. Ortalama eritrosit hacminde artış hematolojik toksisiteye eğilimi yansıtır. Hematolojik toksisite veya metotreksat aşırı dozundan kuşulanılırsa derhal folik asit tedavisine başlanılmalıdır. Metotreksat dozundan 24-48 saat sonra, metotreksatın dozuna eşit miktarda verilmelidir. Kemik iliği toksisitesi folat tedavisine cevap verir ve folik asit proflaktik olarak verilmelidir. (51, 53, 54)

2.3.5.4.Renal Yan Etkiler

Düşük doz haftalık metotreksat ile renal toksisite bildirilmemiştir. İlaç böbreklerden atıldığı için renal yetmezlikte kullanılmamalıdır. Renal fonksiyonların düzenli takibi gerekmektedir. (54)

2.3.5.5.Üreme Sistemi Üzerine Yan Etkiler

Kanser kemoterapisinde kullanılan yüksek doz metotreksat ile geçici oligospermi olabilir. Overian disfonksiyon ise bildirilmemiştir. Metotreksat teratojen bir ajandır. Konsepsiyon düşünüldüğünde kadınlarda en az 1 ovarian siklus erkeklerde de 90 gün önceden ilaç kesilmelidir.(51-54)

2.3.5.6.Neoplastik Yan Etkiler

Son yıllarda metotreksat kullanan olgularda lenfoma sıklığında artış gözlenmektedir. Hematolojik malignite sıklığında ise artış saptanmamıştır. (51)

2.3.5.7.Akciğerler Üzerine Yan Etkiler

Metotreksat ile pulmoner toksisite akut veya kronik olabilir. Pulmoner reaksiyon %3-5 sıklıkta bildirilmiştir. Akut başlayan öksürük, nefes darlığı, hafif ateş, taşipne, akciğer bazallerinde iki taraflı rallerin ortaya çıkması hekimi uymalıdır. Akciğer grafilerinde bilateral intersitisyel parankimal infiltrasyon tespit edilmesi ve balgam kültürlerinin negatif olması metotreksata bağlı hipersensivite pnömonisini akla getirmelidir. Hastanın 60 yaşın üzerinde olması, akciğer ve plevra hastalıklarının varlığı, daha önce başka modifiye edici ajanların kullanılmış olması albuminde düşüklük, sigara, diyabetes melitus metotreksatın akciğerlere toksisitesini kolaylaştırır. Hafif olgularda ilacın kesilmesiyle sorun çözülürken ileri vakalarda yüksek doz steroid ve solunum desteği gerekebilir. (51, 53, 54)

2.3.5.8.Karaciğer Üzerine Yan Etkiler

Haftalık düşük doz metotreksat tedavisi ile hepatotoksisite riski düşüktür, ancak alkol, kullanımı diyabetes mellitus, kronik hepatit B ve C taşıyıcılığı, obezite alfa-1 antitripsin eksikliği riski arttıran faktörlerdir. Metotreksat kullanan olgularda hastalık aktivitesi düzelirken belirli aralarla yapılan karaciğer fonksiyon testlerinde yükselme ve serum albumininde düşme görülür. Dört sekiz hafta ara ile karaciğer fonksiyon testleri ile takibi gerekmektedir. Eğer AST, ALT normalin 2 katından fazlaysa ilaç kesilmelidir, hafif yükselmeler ise takip edilebilir. İlaç kesilmesine rağmen takiplerde karaciğer fonksiyon testlerinde düzelme olmazsa karaciğer biyopsisi gerekebilir. (52, 53, 54)

2.3.5.9.Diğer Yan Etkiler

Baş ağrısı, kilo kaybı, yorgunluk, ateş, poliartralji, baş dönmesi, grip benzeri semptomlar olabilir. Bu yan etkiler folik asit desteğine cevap verir. (54)

2.4. SEÇİCİ GEÇİRGEN MEMBRAN

Klinik uygulamada yer bulan 4 ayrı bariyer materyali; hyalürinidaz ve karboksimetil selüloz içeren bioresorbabl membran (Seprafilm®), ekspande politetrafluroethylene (Gore-Tex®), okside rejenere selüloz (Interceed®) ve pericordium kollejen membran(BoneProtect Membran dentegris®)dir.

Hyaluridaz ve Karboksimetil Selüloz içeren Bioresorbabl Membran (Seprafilm®) hem genel cerrahide hem de jinekolojik cerrahide yaygın kullanılırken ekspande politetrafluroethylene (Gore-Tex®) sadece jinekolojik cerrahide ve pericordium kollejen membran(BoneProtect Membran dentegris®) ise daha çok dental cerrahide kullanılmaktadır.

Hyaluridaz ve Karboksimetil Selüloz içeren Bioresorbabl Membran (Seprafilm®) (Genzyme Corp., Cambridge. ABD) bioabsorbabl membran, Sodyum Hyalürinat ile Karboksimetil Selüloz'un birleşmesiyle oluşan steril, translüent bir membrandır. Hyalürinat bağ dokusunda doğal olarak bulunan antiadheziv özellikler bulunduran, yara iyileşmesini hızlandıran bir yapıdır. Karboksimetil Selüloz'un adezyon oluşumunu azaltma mekanizması açık değildir.

İntraperitoneal olarak yerleştirilen Karboksimetil Selüloz'un çevresine sıvı topladığı, bu yolla hidrofotasyon etkisiyle seroza ile peritonun doğrudan temasını önlediği görülmüştür. Ayrıca silikonizasyon etkisiyle de intraperitoneal yüzeyleri kapladığı ve travmatize olan yapıların karşılıklı gelmesini engellediği yönünde bilgiler mevcuttur. (55) Karboksimetil Selüloz mekanik bir bariyer olarak çalışır.

Abdominal kavitede peritoneal iyileşme sırasında batın içerisinde organlar arasında emilmeden kalır. İntraperitoneal kullanımı takiben hızla jel formuna dönüşür. Yedinci günde periton tarafından absorbe edilir, 28. günde yok edilir. Karboksimetil Selüloz'un serozal fibroblastik aktivite üzerinde supresyon oluşturması diğer bir mekanizmadır. Plateletler, endotelial ve inflamatuvar hücrelerden fibroblast aktive edici sitokinlerin salınımını baskılayarak ya da makrofajlardan salınan fibroblast büyüme inhibitörlerini indükleyerek bu etkisini gösteriyor olabilir.(55-59)

Karboksimetil Selüloz'un yara iyileşmesi üzerindeki doza bağımlı olumsuz etkisinin bu yolla ortaya çıktığı düşünülmektedir. Hyaluridaz ve Karboksimetil Selüloz içeren Bioresorbabl Membran (Seprafilm®)'in postoperatif batın içi yapışıkları azalttığı hayvan ve klinik çalışmalarda gösterilmiştir. (60-64)

Interceed TC7 Okside rejine selülozdan oluşur. İntraperitoneal uygulandıktan yaklaşık sekiz saat sonra jelatinöz bir yapıya dönüşür ve bu jel yirmi sekiz gün içinde tamamen emilir. Yapılan çeşitli çalışmalarda (65-67) adezyon oluşumunu önlemede

etkili olduğu bildirilmesine karşın yapılan karşıt çalışmalarda periton hasarına neden olarak adezyon oluşumuna katkıda bulunabileceği savunulmaktadır.(55, 68, 69)

Bağırsak yüzeylerin birbiriyle temasını engellemek suretiyle adezyon oluşumunu önlemek amacıyla intraperitoneal oksijen , sıvı parafin ve diğer kayganlaştırıcı maddeler, çeşitli membran oluşturucular (gümüş tozları, silikon, zeytin yağı, amniyotik sıvı) ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Ancak sonuçlar çok yüz güldürücü olmamıştır.(70, 71)

2.4.1. Gore-Tex

Gore-Tex absorbe olmayan ve teflon polimerlerin porlar oluşturacak şekilde ekspande edildiği bir materyaldir.(72) İntraabdominal adezyonları önlemede başarılı çalışmalar bildirilmesine rağmen sütüre edilmesi gerekliliği nedeniyle kullanım güçlüğü ve absorbe olmadığı için peritoneal boşlukta yabancı cisim olarak kalması nedeniyle ideal bir materyal olarak kabul edilmemektedir.(68, 69, 73)

2.4.2. BoneProtect Membran

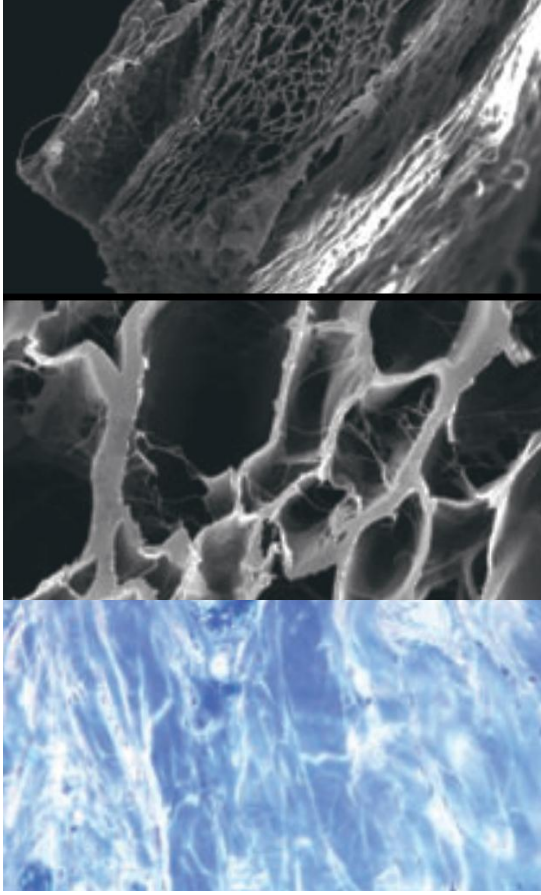
BoneProtect Membran, perikardiyum doku ile elde edilen doğal bir kollajen membrandır. Özellikle doku rejenerasyonu için geliştirilmiş ve üretilmiştir. BoneProtect Membran kullanım kolaylığı, hedeflenen yara iyileşmesi ve olağanüstü doğal biyomekanik özelliklerini tedavi edici güvenliği ile birleştirir.

Güçlü doğal çapraz bağlantı özellikleri sayesinde, dokulara uzun vadeli uygun bariyer fonksiyonu özelliği sağlar. BoneProtect Membran doğal yumuşak doku özelliklerine sahip ve yoğun yapısı yüzünden kan damarları için bir rehber olarak hizmet veren bir engebeli yüzü vardır.

Oniki ile yirmidört hafta arası uzun süreli bariyer fonksiyonu sağlar. Doğal yapısı ve minimum kalınlıkta (yaklaşık 0,3 mm ve 0,4 mm) olması nedeniyle hızlı yara iyileşmesine olanak sağlar.

Kuru ya da ıslak kullanıma uyumluluğu nedeniyle kolay kullanım sağlar. Üç boyutlu yapısı sayesinde hızlı vaskularizasyona neden olur ve tüm bölgelerde yüksek

parçalanma gücüne sahiptir.(Şekil 2) Hidrofilik özellikleri sayesinde hızlı dehidrasyon ve mükemmel yüzey adaptasyonu mevcuttur.



Bone protect membranının yapısı

Bone protect membranının 3D yapısı

İmplantasyondan 2 hafta sonraki histolojik yapısı

Şekil 2. Bone Protect Membranının Yapısı

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.DENEY HAVYANLARI

Bu çalışmada; 8-12 haftalık ve ağırlıkları 200–250 gram arasında olan 36 adet Wistar-Albino cinsi dişi sıçan kullanıldı. Deney hayvanlarının bilimsel amaçla kullanılması için Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulu onayı alındı ve çalışmamız etik kurul kurallarına uygun olarak yapıldı

3.2. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI VE DENEYİN YAPILMASI

Hayvanlar rastgele olarak 6 gruba ayrılarak her bir kafeste 6 hayvan olacak şekilde laboratuvar ortamında preoperatif 48 saat süre ile izlendiler. Çalışma süresince sıçanlara limitsiz olacak şekilde musluk suyu (ad libitum) ve standart kemirgen yemi verildi. Hayvanlar 22 santigrad derece (°C) sıcaklıkta, 12 saat aydınlıkta ve 12 saat karanlıkta kalacak şekilde takip edildiler. Deney hayvanlarına anestezi madde olarak Xylazine HCL(10 mg/kg) ve Ketamine HCL (60-100 mg/kg) kombinasyonu intraperitoneal olarak uygulandı ve ortalama 1 saatlik bir anestezi süresi sağlandı.

Operasyon esnasında veya sonrasında antibiyotik profilaksisi yapılmadı. Çalışmada hiç hayvan kaybedilmedi. Takiplerde hiçbir sıçanda yara yeri enfeksiyonu izlenmedi.

Kullanılan CPC' nin sıvı ve toz fazı vardı. Sıvı toz oranı 0,4 'dü. Toz içinde çeşitli kalsiyum fosfat bileşenleri bulunuyordu(tetrakalsiyum fosfat, dikalsiyum fosfat dihidrat ve hidroksi apatit). Sıvı faz %0.05' lik fosforik asitti. Elli gram kalsiyum fosfat çimentosuna sırasıyla 0, 100 ve 250 mg MTX solüsyonu eklenerek %0, %2 ve %5'lik MTX CPC karışımları oluşturuldu.

Çalışmada DENTEGRİS marka doğal rezorbe kollejen membran kullanıldı(Şekil 3). 30x40 mm boyutundaki membranlar steril olarak uygun boyutlara ayrıldı.



Şekil 3

Otuz altı sıçandan rastgele 6 grup oluşturuldu. Altı grup A,B,C,D,E ve F olarak isimlendirildi (Tablo 1). A grubuna femur orta $\frac{1}{2}$ şaft osteotomisi sonrasında kirschner teli ile intramedüller fiksasyon uygulandı ve osteotomi hattına CPC uygulandı. B grubuna femur orta $\frac{1}{2}$ şaft kısmına osteotomize edilmesi sonrasında kirschner teli ile intramedüller fiksasyon uygulandı ve osteotomi hattına CPC ve etrafına kollagen membran uygulandı. C grubuna femur orta $\frac{1}{2}$ şaft kısmına osteotomize edilmesi sonrasında kirschner teli ile intramedüller fiksasyon uygulandı ve osteotomi hattına %2 MTX ile karıştırılmış CPC uygulandı. D grubuna femur orta $\frac{1}{2}$ şaft kısmına osteotomize edilmesi sonrasında kirschner teli ile intramedüller fiksasyon uygulandı ve osteotomi hattına %2 MTX ile karıştırılmış CPC ve etrafına kollagen membran uygulandı. E grubuna femur orta $\frac{1}{2}$ şaft kısmına osteotomize edilmesi sonrasında kirschner teli ile intramedüller fiksasyon uygulandı ve osteotomi hattına %5 MTX ile karıştırılmış CPC uygulandı. F grubuna femur orta $\frac{1}{2}$ şaft kısmına osteotomize edilmesi sonrasında kirschner teli ile intramedüller fiksasyon uygulandı ve osteotomi hattına %5 MTX ile karıştırılmış CPC ve etrafına kolagen membran uygulandı.

Takiplerinde 3,7. ve 14. günlerde ikişer adet sıçan yüksek doz anestezik ile sakrifiye edildi. Sıçanlar öldürüldükten sonra sol femurları kalça ve diz eklemlerinden dezartiküle edildi. Femur üzerindeki yumuşak dokulara zarar verilmeden tüm sağ uyluk klinik ve histolojik olarak incelendi

Tablo 1. Deney hayvanları dağılım tablosu

Grup Adı	Grup İçeriği	Grup Sayısı
A	CPC	6
B	CPC + Membran	6
C	%2 MTX CPC	6
D	%2 MTX CPC + Membran	6
E	%5 MTX CPC	6
F	%5 MTX CPC+ Membran	6

3.3.AMELİYAT TEKNİĞİ

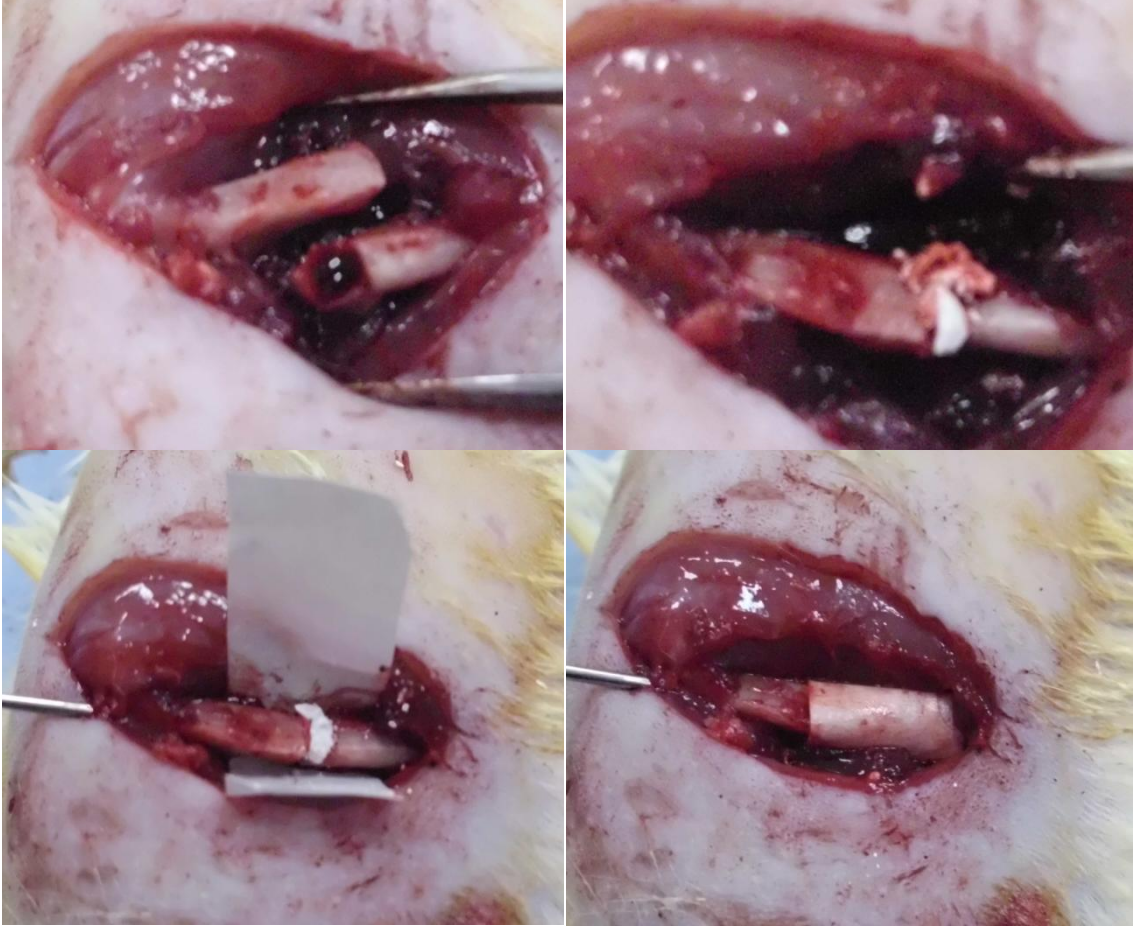
Anestezi sonrası sıçanların sağ uylukları traş edildi, povidon iyot (Betadine®) ile boyanıp, steril örtülerle örtüldü. Sağ uyluk lateralinden 2cm insizyon sonrası, vastus lateralis ve hamstring adale grupları arasından geçilerek femur cismine ulaşıldı.

İnsizyon boyuca yumuşak dokular ekarte edildi, periost kesildi. Femur cisminde kostatom aracılığı ile transvers osteotomi alanı oluşturuldu. 1.2 mm'lik kirschner teli ile trokanter majordan distale doğru, elektrikli matkap yardımıyla intramedüller olarak tespit edildi.

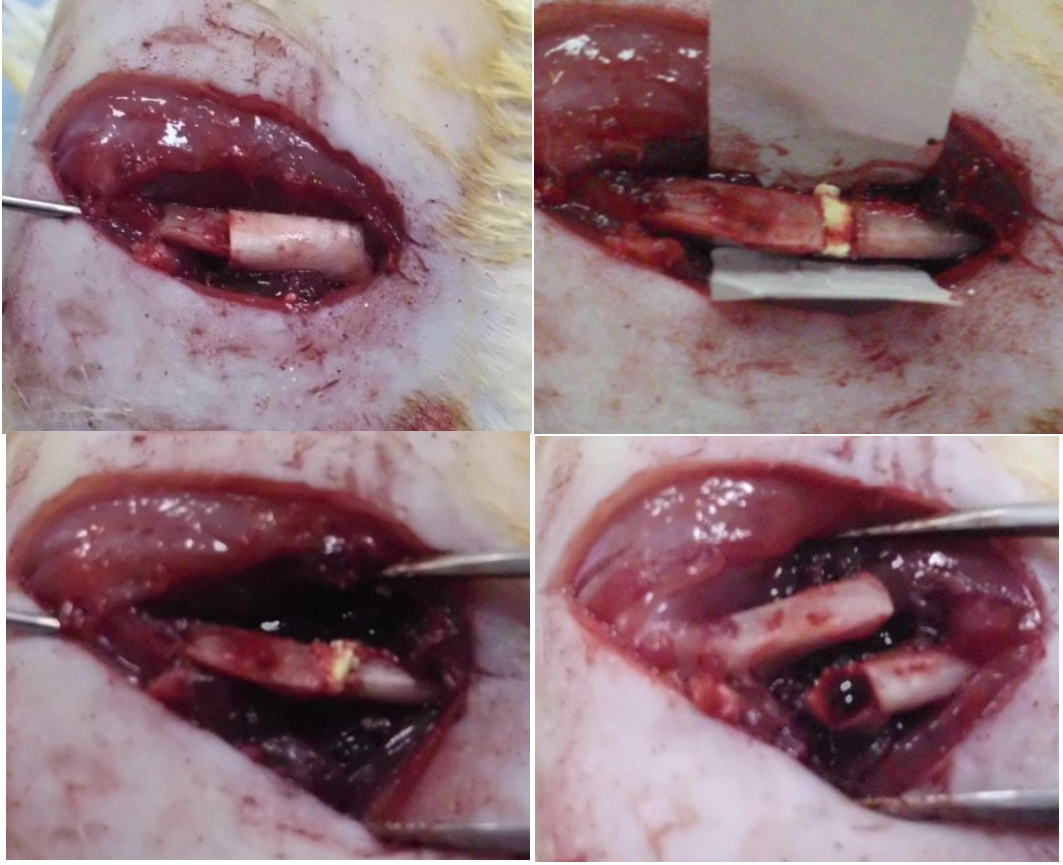
Osteotomi hattına A grubuna kalsiyum fosfat çimentosu uygulandı. B grubuna kalsiyum fosfat çimentosu ve seçici geçirgen BoneProtect Membran uygulandı. (Şekil 4)

C grubuna %2 MTX ile karıştırılmış kalsiyum fosfat çimentosu uygulandı. D grubuna %2 MTX eklenmiş kalsiyum fosfat çimentosu ve seçici geçirgen kollejen membran uygulandı. E grubuna %5 MTX ilave edilmiş kalsiyum fosfat çimentosu uygulandı. F grubuna %5 MTX eklenmiş kalsiyum fosfat çimentosu ve seçici geçirgen kollejen membran uygulandı. (Şekil 5)

Trokanter tarafındaki iğnenin ucu eğilip cilt altında bırakıldı. Ciltaltı absorbe olan sütür materyali ile cilt ise absorbe olmayan dikişle kapatıldı. Yara bölgesi tekrar povidon iyot ile temizlendi ve sıçanlar kafeslerine kondu



Şekil 4. Osteotomi hattı CPC ve membran uygulanması



Şekil 5. Osteotomi hattı %2 ve%5'lik MTX+CPC ve membran uygulanması

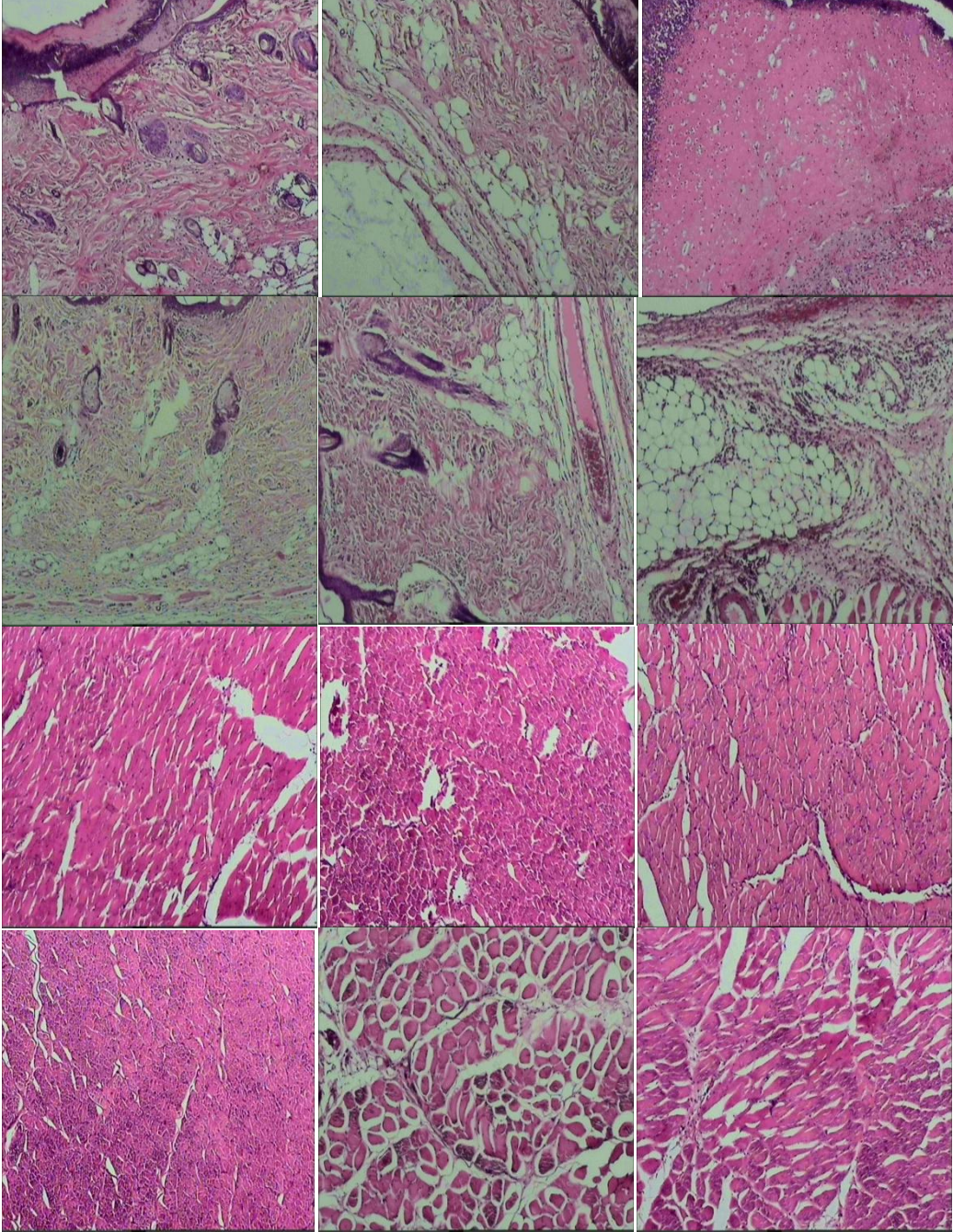
3.4. HİSTOLOJİK İNCELEME

Örnekler daha sonra %10 tamponlu formalin içinde bir hafta fikse edildi. %70-80-90-100 alkol çözeltileri içerisinde birer saat bekletildi. İki aşamalı xylene solüsyonunda 2 saat takip edildikten sonra 2 aşamalı sıvı parafin içine alındı.

Bloklama işleminden sonra yara hattından 4-5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Deparafinizasyon işleminden sonra boyama işlemine geçildi. Merk marka Harris hematoksilin solüsyonunda 3-5 dakika bekletildi.

Takiben Merk marka Eozin solüsyonunda 30 saniye bekletildi. Preparatlar son olarak xylene solüsyonunda 10-15 dakika daha bekletilerek mikroskopta bakılabilir hale getirildi. Hematoksilin ve Eozin (H&E) ile boyanan kesitler ışık mikroskopisi altında $5 \times 10 \times 20$ büyütmelemlerde incelendi. Kesitler $\times 20$ büyütmede rastgele olarak her sıçandan 20 alanda inflamatuvar hücre sayımı yapıldı. Kesitlerden kas ve cilt altı bağ dokusu

şeklinde sayımlar gerçekleştirildi.(Şekil 6) Sonuçlar için istatistiksel olarak Wilcoxon Signed Ranks ve NPar Tests istatistiksel analiz testleri kullanıldı.



Şekil 6. CPC ve CPC+MTX preparatlarının bağ ve kas dokusu histolojisi

4.BULGULAR

4.1.BAĞ DOKUSU İÇİN SONUÇLAR

Her grupta 6 adet denek mevcuttu. Bağ dokusuna göre gruplar arasında hücre sayımı açısından anlamlı bir fark yoktu. Grupların ortalama değerleri göz önüne alınacak olursa CPC grubunun ortalama değeri 43.4167, CPC + membran grubunun ortalama değeri 41.85, %2 MTX eklenmiş CPC grubunun ortalama değeri 40.7667 , %2 MTX eklenmiş CPC + membran grubunun ortalama değeri 50.4667, %5 MTX eklenmiş CPC grubunun ortalama değeri 40.40 ve %5 MTX eklenmiş CPC + membran grubunun ortalama değeri 55.0167 olarak bulundu.(Tablo 2) Buda bize istatistiksel olarak olmasa bile klinik olarak CPC ve CPC + membran grubunda ortalama değer bakımından fark olmadığı anlamına gelmektedir.

Ortalama değerler açısından %2 MTX eklenmiş CPC grubu ve %2 MTX eklenmiş CPC + membran grubunda, membran eklenmiş grubun ortalama hücre sayısı daha fazla olması bize membran ile MTX geçirgenliğini azaltılması hücre proliferasyonu üzerindeki negatif etkinin azalmasına neden olabilmektedir. Yine aynı şekilde %5 MTX eklenmiş CPC grubu ve %5 MTX eklenmiş CPC + membran grubunda, membran eklenmiş grubun ortalama hücre sayısı daha fazla olması bize yine aynı şekilde membran ile MTX geçirgenliğini azaltılması hücre proliferasyonu üzerindeki negatif etkinin azalması düşüncemizi desteklemektedir.

Tablo 2.Bağ dokusu için sonuçlar

Gruplar (Bağ dokusu için)	Ortalama hücre sayısı	Standart deviasyon
CPC grubu	43,4167	7,8316
CPC+ membran grubu	41,8500	14,4082
%2 MTX CPC grubu	40,7667	14,4992
%2 MTX CPC + membran grubu	50,4667	7,0212
%5 MTX CPC grubu	40,4000	11,4670
%5 MTX CPC + membran grubu	55,0167	10,6947

%2 MTX eklenmiş CPC grubu ve %5 MTX eklenmiş CPC grubu arasında ortalama değer açısından fark olmaması yine aynı şekilde %2 MTX eklenmiş CPC + membran grubu ve %5 MTX eklenmiş CPC + membran grubunda ortalama değer olarak hücre sayısında membran eklenmeyen gruplara göre artış olmasına karşın membranlı gruplar arasında yine fark olmaması bize %2 ve %5 MTX eklenmiş gruplarda lokal yan etki olarak fark olmadığı gösteriyor.

4.2.KAS DOKUSU İÇİN SONUÇLAR

Her grupta yine 6 adet denek mevcuttu. Kas dokusuna göre gruplar arasında hücre sayımı açısından anlamlı bir fark yoktu. Grupların ortalama değerleri göz önüne alınacak olursa CPC grubunun ortalama değeri 32,1333, CPC + membran grubunun ortalama değeri 26,4333, %2 MTX eklenmiş CPC grubunun ortalama değeri 29,7500, %2 MTX eklenmiş CPC + membran grubunun ortalama değeri 34,5917, %5 MTX eklenmiş CPC grubunun ortalama değeri 27,30 ve %5 MTX eklenmiş CPC + membran grubunun ortalama değeri 31,0833 olarak bulundu.(Tablo 3)

Tablo 3.Kas dokusu için sonuçlar

Gruplar (Kas dokusu için)	Ortalama hücre sayısı	Standart deviasyon
CPC grubu	33,1333	6,8797
CPC+ membran grubu	26,4333	5,1869
%2 MTX CPC grubu	29,7500	8,2148
%2 MTX CPC + membran grubu	34,5917	3,8641
%5 MTX CPC grubu	27,3000	2,8580
%5 MTX CPC + membran grubu	31,0833	3,8934

Buda bize istatistiksel olarak fark olmasa bile klinik olarak bağ dokusunda olduğu gibi CPC ve CPC + membran grubunda ortalama değer bakımından fark olmadığı anlamına gelmektedir. Ortalama değerler açısından %2 MTX eklenmiş CPC grubu ve %2 MTX eklenmiş CPC + membran grubunda, membran eklenmiş grubun ortalama hücre sayısı daha fazla olması bize membran ile MTX geçirgenliğini azaltılması aynı bağ dokusunda olduğu gibi hücre proliferasyonu üzerindeki negatif etkinin azalmasına neden olabilmektedir. Yine aynı şekilde %5 MTX eklenmiş CPC grubu ve %5 MTX eklenmiş CPC + membran grubunda, membran eklenmiş grubun ortalama hücre sayısı daha fazla olması bize yine aynı şekilde membran ile MTX geçirgenliğini azaltılması hücre proliferasyonu üzerindeki negatif etkinin azalması düşüncemizi bağ dokusunda olduğu gibi desteklemektedir.

4.3.BAĞ DOKUSU VE KAS DOKUSU ARASINDAKİ SONUÇLAR

Her 6 grupta grup içi bağ ve kas dokusu arasında istatistiksel olarak anlamlı olarak fark bulundu. Grup 1 CPC grubunda $p=0.028$ ($p<0.05$) olarak bulundu ve bağ

dokusunda hücre yoğunluğu kas dokusuna göre daha fazla olarak değerlendirildi. Grup 2 CPC + membran grubunda $p=0.046$ ($p<0.05$) olarak bulundu ve bağ dokusunda hücre yoğunluğu kas dokusuna göre daha fazla olarak değerlendirildi. Grup 3 %2MTX eklenmiş CPC grubunda $p=0.046$ ($p<0.05$) olarak bulundu ve bağ dokusunda hücre yoğunluğu kas dokusuna göre daha fazla olarak değerlendirildi. Yine grup 4 %2MTX eklenmiş CPC + membran grubunda $p=0.028$ ($p<0.05$) olarak bulundu ve bağ dokusunda hücre yoğunluğu kas dokusuna göre daha fazla olarak değerlendirildi. Grup 5 %5 MTX eklenmiş CPC grubunda $p=0.046$ ($p<0.05$) olarak bulundu ve bağ dokusunda hücre yoğunluğu kas dokusuna göre daha fazla olarak değerlendirildi. Grup 6 %5 MTX eklenmiş CPC + membran grubunda $p=0.028$ ($p<0.05$) olarak bulundu. Bunlara bağlı bağ dokusunda hücre yoğunluğu kas dokusuna göre diğer gruplarda olduğu gibi daha fazla olarak değerlendirildi.

4.4.GÜNLERE GÖRE GRUPLAR

4.4.1.Günlere Göre Bağ Dokusu Sonuçları

Günlere göre denekler 3. 7. ve 14. gün olarak 3 gruba ayrıldı. Bağ dokusu histolojik incelemesinde 7. gün ve 14. günler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark mevcuttu. Üçüncü gün histolojik olarak ortalama hücre sayısı 45,9083 ve standart deviasyonu 13,1798, 7. Gün ortalama hücre sayısı 50,8667 ve standart deviasyonu 12,2243 ve 14. gün ortalama hücre sayısı 39,1833, standart deviasyonu 7,2521 olarak bulundu.

Yedinci günden 14. güne doğru hücre sayısında anlamlı bir düşüş ortaya çıktı. Fakat 3. gün ile 7 ve 14. günler arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi.(Tablo 4) Üçüncü ve 7. günlerde inflamatuvar hücre sayısı iyileşme sürecinin başındaki süreçlere bağlı olarak fazla miktarda olurken 14. güne doğru hücre sayısında anlamlı bir düşüş olmaktadır.

Tablo 4. Günlere göre bağ dokusu sonuçları

Günler(bağ dokusu)	Ortalama hücre sayısı	Standart deviasyon
3. gün	45,9083	13,1798
7.gün	50,8667	12,2243
14. gün	39,1833	7,2521

4.1.2.Günlere Göre Kas dokusu Sonuçları

Kas dokusu histolojik incelemesinde 3. gün ile hem 7. gün hem de 14. günler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark mevcuttu. Üçüncü gün histolojik olarak ortalama hücre sayısı 31,6958 ve standart deviasyonu 5,9877, 7. gün ortalama hücre sayısı 33,2333 ve standart deviasyonu 4,8688, 14. gün ortalama hücre sayısı 25,7167 ve standart deviasyonu 3,6418 olarak bulundu.(Tablo 5)

Üçüncü günden 7. güne hücre sayısında anlamlı bir artış olurken yine 3. günden 14. güne hücre sayısında anlamlı bir düşüş ortaya çıkmaktadır. Fakat 7. ve 14. günler arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi. Bu sonuçla bağ dokusunda görülemeyen 3. ve 7. gün arasındaki hücre farkı kas dokusunda 7. günde artma yönünde karşımıza çıkmaktadır. Yine aynı bağ dokusundaki gibi 3. ve 7. günlere göre 14. günde hücre sayısındaki azalma doku iyileşme süreçlerinin artık tamamlanmasına işaret edebilir.

Tablo 5. Günlere göre kas dokusu sonuçları

Günler(kas dokusu)	Ortalama hücre sayısı	Standart deviasyon
3. gün	31,6958	5,9877
7.gün	33,2333	4,8688
14. gün	25,7167	3,6418

5.TARTIŞMA

Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda kemoterapötik ajan yüklü akrilik sementin kemik lezyonlarının tedavisindeki kullanımı araştırılmış. İlk olarak Hernigou MTX'in metipolimetokrilik implanttan salınımını çalışılmış. Sement polimerizasyonu ilacı etkisizleştirmedeği ve 18 saat içinde %10 gibi bir salınım gerçekleştiği bulunmuş. Bazı salınımlarında 6 ay gibi uzun süre devam ettiği görülmüş.

Osteosarkomlu sıçanlardaki in vivo deneylerde sement içindeki MTX'in doz bağımlı, hem lokal hem genel etkileri mevcut olduğu gösterilmiştir. On yedi serilik büyük köpekli spontan osteosarkomlu grup lokal rezeksiyon ve sonrasında MTX içerikli sement ile tedavi edilmiş. Genel kemoteropötik etki 2 saatten 5 güne kadar saptanabilir durumdaymış. Takiplerinde sağ kalım artmış ve lokal rekürrens azalmış. Ancak 4 vakada gecikmiş yara iyileşmesi gerçekleşmiş. Bu durum MTX'in lokal reaksiyonu sonucu mu yoksa operasyonun doğal seyri nedeniyle mi ortaya çıktığı kesin olarak bilinmemekle birlikte MTX'in yan etkisi ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.(74)

Yine Hernigou ve ark yaptığı klinik bir çalışmada genel kemoterapiye uygun olmayan 14 primer veya metastatik tümörlü hasta seçilmiş. Vakanın deneydeki yüksek MTX konsantrasyonu (kandakinin 10000 katından fazla) ve ilk birkaç gündeki genel kemoteropötik etki, son 3 haftalık üriner atılımı doğrulanabilmiş. MTX'in salınım ve diffüzyonu yaklaşık olarak aynı, sementin şekli ve yeri farklı olsada (4 ü pelviste, 5 i metastatik kırıklı intertrokanterik alanda, 3 ü metastazlı torakal vertebrada) lokal kemoterapi iyi tolare edildiği bulunmuş. MTX ile ilişkili anemi azalmış, akyuvar veya trombosit veya değişmiş kreatinin klerensi gözlenmemiş ve hiçbir hastada genel toksite göstermemiş olarak bulunmuştur.(75)

Bir antineoplastik bir ajan olan MTX'in yavaş salınımı için implante edilebilir sistemler üzerine birçok çalışma mevcuttur. Bu sistemler kalsiyum fosfatın apatit çöktürücüleri dekstran ve değişik miktarlarda MTX'in toz halindeki karışımı ile

oluşturulmuştur. Bir matriks olarak kullanılan kalsiyum fosfatın olağan üstü bir bağlanma ve sıkıştırma özelliği vardır. Aynı zamanda kalsiyum fosfat bir osteokondüktör ve biyolojik olarak ayrışabilir.

Bu sistemler üzerine yapılmış invitro bir çalışmada MTX'in zamanla salınımı yavaşlar ve MTX'in kararsız apatit üzerinde tutunma tekrar geri bırakma fenomenine bağlı uzamıştır. İmplantların kompozisyonu zamanla sitokiyometrik apatit yönünde değişir. İnvivo yapılan bir pilot çalışma tavşanları lateral femoral kondiline implantasyon ile yapılmış. Farmatokinetik bir çalışmada kan MTX konsantrasyonunun her zaman toksik seviyelerin altında olduğu ortaya çıkmıştır. Başlangıç MTX konsantrasyonunun %20 si 7 gün sonra hale implant içinde kalmıştır. İmplantların ayrışması ve biyouyumluluk ve biyoreaktivite çalışması herhangi bir zamanda hiçbir lokal nekroz olmadığını göstermiştir.

Maling hücrelerin metabolizmasıyla güçlü bir etkileşim içinde olan kemoterapötik ajanlar bazı tümörlerin tedavisinde geniş kullanım alanı bulmuştur. Kemoterapinin 2 rolü vardır; Yetersiz rezeksiyon veya rekürrens sonrası lokal olarak postoperatif tümör kontrolünde ve metastazların yayılımını önlenmesidir.

Bununla birlikte antikanser ajanların toksisitesi sebebiyle kemoterapi tedavisinin halen sınırları vardır. Örneğin osteojenik osteosarkom tedavisinde kullanılan MTX için uygulama dozu ve frekansı hematopoetik dokular ve bukkal veya GİS mukozası üzerindeki toksisitesine bağlıdır. Bu ajanların lokal olarak uygulanması gerçekten ilgi çekicidir. Çünkü ilacın lokal olarak uygulanması ile çok yüksek lokal konsantrasyonlar elde edilirken dolaşım konsantrasyonları düşüktür ve iyatrojenik sekonder etkiler ortaya çıkmamaktadır. Dahası MTX'in yavaş salınımı kullanışlıdır. Çünkü zaman etkisi ki burada (hücrelerin bu ilaca sensitivitesi zamanla artar) doz etkisinden daha büyüktür.

Tüm bu sebeplerle ilaç yavaş salınım sistemleri kullanılarak bu ajanların uygulanması üzerine çalışma yapılmıştır. Lokal ve yavaş salınım sistemleri matriks olarak kemik çimentosu, kollejen veya poroz seramikler kullanılarak osteoartiküler patolojilerin önlenmesi ve tedavisinde kullanılmıştır(76).

Taşıyıcı olarak kalsiyum fosfat kullanımı mümkün olabilir. Bu bileşenlerin bazıları biyouyumlulukları ve osteokodüksiyonları sebebiyle iyi bilinirler ve girişimlerde hep bu amaç uğrunadır. Poroz seramikler sıklıkla kullanılmıştır ve yapılan

çalışlarda önce teropatik ajanlarla geirgenleştirilmiş, daha sonra polimer veya mum ile delikler kapatılmıştır. Diğer girişimler toz karışımların bir araya getirilmesiyle teropatik ajanın kalsiyum fosfat içine yüklenmesi üzerine yapılmıştır. Daha nceki çalışmalar göstermiştir ki kararsız bir hidrosi apatit ile birlikte aynı atomik CA/P oranında (1.33) bileşimi sonucu oluşan triklinik oktakalsiyum fosfat ($Ca_8(PO_4)_4(HPO_4)_2 \cdot 5H_2O$) yapısındaki özel bir kalsiyum fosfat uygulama için çok elveriliidir. Formülü $Ca_8(PO_4)_3 \cdot 5(HPO_4)_2 \cdot 5(OH)_0.5$ olan bileşim apatitik oktakalsiyum fosfat veya OCPa olarak isimlendirilmiştir. OCPa'nın ilaç biliminde kullanılan bağlayıcılardan çok daha iyi olan olağan üstü bir bağlama özelliği vardır.(77) Ek olarak yavaş ilaç salınımına izin veren bağlama/geri salma gibi çok iyi özellikleri de vardır. OCPa apatitik seramiklerden daha hızlı ayrışır ve hızlı kemik gelişimine izin verir. yapılan çalışmalarda MTX'in yavaş salınım uygulamasının biyoayrışabilir kalsiyum fosfat matriksi ile bileşimi ile mümkün olabileceğini göstermiştir. Kalsiyum fosfat matriksi biyoyumluluğu ve biyoreaktivitesi(osteokondüksiyon) açısından iyi bilinir. Ayrıca bu sistemdeki yavaş salınım diğer birçok vakada olduğu gibi yalnızca poroziteye bağlı olmadığını göstermektedir. Ancak temel olarak MTX'in OCPa içine geri dönüşümlü bağlanmasına bağlıdır. Bu görüntü daha önceki alışmalardada vurgulanmıştır.(79, 80) Yine farklı bir çalışmada bir antikanser ilaç olan cisplatinin davranışları incelenmiştir. Cisplatin karboksilik gruplar içermeyen kapalı bir kimyasal maddedir. Sonuçlar göstermiştir ki MTX'in bağlanımı asidik grupları içermez ancak bu moleküllerin halkalarına veya amin gruplarına affinitesi daha yüksektir.

Dahası yapılan çalışmalarda matriks olarak kullanılan apatitik kalsiyum fosfat düşük sıcaklıkta hazırlanmıştır. Bu sebeple yüksek sıcaklıklarda hazırlanan diğer fosfatlardan çok daha ayrışabiliridir. Tarif edilen yavaş salınım sistemi birkaç hafta içinde ilacın tamamının salınması avantajını göstermiştir. Birkaç ay içerisinde neredeyse tamamı ayrışmıştır. Halbuki seramik matrikslerde ayrışma ya çok uzun sürmüştür ya da hiç olmamıştır. Bunlara rağmen bu sistem konvansiyonel bileşim teknikleri kullanımı için diğerlerinden daha uygun olduğu düşünülmüştür.(81)

Yine anı çalışmada salınan ilaç agresif olmasına rağmen implantlar lokal nekroza sebep olmamıştır. Dahası salınan ilacı yüksek miktarlarına rağmen dolaşımdaki

seviyeleri düşük ve nontoksiktir. Uzun dönemde osteogenez bile bu çalışmada görülmüştür.

Diğer bir çalışmada kalsiyum fosfat cisplatin birleştirilmiş ve sitotoksitesi araştırılmıştır. Cisplatin dirençli insan over kanseri hücre serisi kullanılan bir invitro hücre proliferasyon deneyinde serbest cisplatin kullanım ile karşılaştırılmıştır. Nanokonjugatlardan salınan cisplatin'in kanser hücre serisi üzerine etkisi serbest ilacın ki ile eşit olarak bulunmuştur.(82) Direk ekleme ile yapılan sitotoksitite çalışmaları atomik olarak kararlı ve negatif yüklü nanokonjugatların ilaç rezistansına sebep olmadığı görülmüştür. Farklı kalsiyum fosfat tiplerinden cisplatin salınımı ile ilgili mevcut çalışmalarda daha az kristalize kalsiyum fosfatın daha yavaş ilaç salınımı ile ilgili olduğunu görülmüş. Bu etki partikülün yüzey alanı ile orantılı ve geniş yüzey alanlı partiküller daha fazla ilaç bağladığı, daha yavaş ilaç saldığı ve yüzey alanı küçük partiküllere göre daha az kararlı olduğu gösterilmiştir.(83)

Farklı bir çalışmada tavşan tibia proksimaline vx2 karsinomu lokal olarak oluşturulmuş. Çalışmada kullanılmış olan vx2 karsinomu tümör implantasyonundan 7 gün sonra kortikal kemik destrüksiyonu oluşmuştur. Bu sonuç histolojik olarak destrüksiyonun tespit edilemediğini savunan diğer çalışmalar ile uyumsuz bir sonuç bulunmuştur.(84, 85) Temel karakteristikleri tümör implantasyonundan 5 gün sonra kortikal kemik destrüksiyonu başlar ve 7. günde kortikal kemiğin %1.33 destrükte olduğu ve sonraki 14. güne kadar osteoklast sayısındaki artışla paralel olarak destrüksiyon da artış olduğu bulunmuştur.(86) Ondördüncü günden sonra osteoklast sayısındaki azalmaya rağmen kortikal kemik destrüksiyonu artmaya devam etmiş olarak bulunmuş. Yine aynı çalışma göstermiş ki havyanlar üzerinde toksik olmayan yüksek dozda MTX kullanımı tümör ile uyarılmış osteoliz miktarını minimize etmek ve patolojik kırıkların cerrahi yönetiminde uygulanabilmek açısından MTX emdirilmiş çimentonun değerini ortaya koymuştur.(87)

MTX dozu arttıkça tüm implantasyon zamanlarında kemik destrüksiyonunda azalma olduğunu göstermiştir. Hatta mikroskopik analizler, yüksek doz MTX grubunda kansellöz kemik destrüksiyonu alanlarında minimize olduğunu göstermiştir.

MTX yüklü akrilik çimentonun lokal uygulanımı ne kadar lokal kemik destrüksiyonunu azaltmada etkili de olsa yüksek dozlarda bile progresif kemik lizisini durduramaz. Bir sıçan sarkom modelinde, Wu ve ark. kemik defektlerini doldurmak için seramik implantlar ve adriamisin emdirilmiş çimento kullanımıyla %54 'lük bir tümör supresyonu elde etmişlerdir.(88) İmplant lokal olarak yüksek ama sistemik olarak düşük bir konsantrasyona ulaşmış olarak bulunmuş.

Vx2 tümörlü tavşan modelinde, yapılan bu çalışmada uygulanan en yüksek dozda MTX (2g/40 g çimento) 'in lokal uygulanması sonrasında lokal kemik destrüksiyon miktarını belirgin şekilde azaldığı ancak tümör hücrelerini tamamen yok edemediği bulunmuştur. Büyük olasılıkla osteoklast proliferasyonunu stimüle eden ve göreve çağıran bu faktörler vx2 hücreleri tarafından halen salınmakta olabileceğinden MTX yüklenmiş çimento kullanımı tümöre bağlı osteolizi tamamen durduramayacak fakat her şeye rağmen devam eden osteoliz miktarını azaltacaktır. Bu çalışmada 40gr çimentoya 2 gr MTX eklenmesi klinik uygulamada devam eden tümöre bağlı osteolizi azalttığını ve gevşeme ve implant yetmezliği riskini düşürdüğünü öngörmektedir. Çimentoya MTX eklenmesi bu yüzden postoperatif radyoterapi veya kemoterapi ile birlikte adjuvan bir tedavi olarak kullanılabilceği üzerinde durulmuştur.(86)

MarcoA. ve ark antineoplastik taşıma sistemi olarak CPC ile paklitaksel kullanmışlardır.(89) Uygulanan CPC alfa trikalsiyum fosfat, kalsiyum fosfat dibazik ve çökeltilmiş HA tozu ve sertleştirme solüsyonu olarakta NA 2 hpo4 solüsyonu kullanılmış. CPC morfolojisini gözlemlemek için tarama elektron mikroskopi, CPC transformasyonunu takip etmek için x-ray difraksiyonu kullanılmış. Çalışmanın tasarımı dikkate alınarak, paklitakselin kanıtlanmış toksisitesi nedeniyle başlangıçta çalışmaya bir protein modeli olarak dana serum albumini (DSA) ile başlanmış. Halen paklitaksel bir taşıma aracı olarak albumine bağlanmaktadır(90). Bu sebeple CPC DSA bileşkesi kararlı bir etkileşimdir.(91, 92) Donma sırasında CPC içinde mikrokanal ve mikroporozitelerden bir ağ oluşur. Böylelikle paklitaksel yüklenirken bu mikrokanallar içerisine yapışır buda yüklenen ilaçların veya proteinlerin neden göreceli olarak uzamış bir yolla salındığını açıklayabilir.

Ek olarak CPC'nin ana bileşeni olan alfa trikalsiyum fosfat bir kalsiyum fosfat apatit tipi içine hidroliz ile hızlı bir transformasyon gösterir. Bununla beraber yaptıkları

çalışmada kalsiyum fosfat kullanarak kemoterapötik ajanların etkin bir yol ile lokal uygulanabileceğini ve bu şekilde daha düşük dozlara ihtiyaç olduğu bulunmuştur. Halen salınan paklitakselin başlangıç miktarları tümör hücre dansitelerini azaltıcı ve hücre büyümesini durdurucu etkinliktedir. Çimentonun degradasyonu sırasında tam bir salınım ortaya çıkar ve metastaz oluşumlarına karşı etkin uzamış bir lokal salınım garantiye alınmıştır. Bu etkinlik yüklenmiş paklitaksel miktarı artırılarak artırılabilir. Ancak bu esnada normal sağlıklı hücreler üzerine etkileri de sürekli değerlendirilmelidir.

Lebugle ve ark. invitro ve tavşan femoral kondil modelinde solid şekil verilemeyen kalsiyum fosfat materyalinden MTX salınımı üzerine çalışmışlardır.(93) Tavşanların kan testleri göstermiştir ki MTX toksik seviyenin altındadır ve 24 saatte kalsiyum fosfat materyaline en başta yüklenen MTX'in %20 si salınmıştır.

Başka bir çalışmada Abe ve ark. paklitaksel yüklenmiş HA-aljinat kompozit boncuklarının etkinliğini değerlendirmişlerdir.(94) Çalışmada bir sıçan modelinin vertebral kolondaki kemik metastaz alanlar üzerine çalışmışlardır. Salınan paklitaksel kemik metastazlarına bağlı olan paraliziye yavaşlatmış, ek olarak yaşam oranları %150 arttırdığı bulunmuştur. Kullanılan boncuklar enjekte edilebilir olmamasına rağmen sistemik uygulama ile karşılaştırıldığında kemoterapötik ajanların lokal uygulamasının daha iyi sonuçlar verdiğini hem de lokal uygulamayla daha düşük dozlar kullanılır böylece istenmeyen ikincil etkilerin zararları azaltılmış olduğunu göstermişlerdir.

Rosa ve ark yaptığı çalışmada akrilik kemik çimentosuna 3 farklı antineoplastik ilaç eklenerek arasındaki farklar ve çimentodan salınımları invitro olarak incelenmiştir. Akrilik kemik çimentosuna sırasıyla doksorubisin, cisplatin ve MTX eklenmiştir. Karışımlar invitro ortamda MCF-7 insan meme kanseri hücresi üzerinde ekilerek bütün ilaçların aktif bir formda karışımdan serbestleştiği gösterilmiştir. Deneylerin ilk ayağı gösterdi ki seçilen ilaçlar MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde anlamlı biyolojik etkiler gösterdi ve bu hücre inhibisyonu silindirler hemen kullanıldığında veya 15 gün gecikmeli kullanıldığında aynı olduğu bulunmuştur. Böylece silindirler kemoterapötik aktivitelerini bu zaman geçişinde koruduğu görülmüştür. Deneyin ikinci ayağında, klinik şartlara daha yakın bir test yapılmıştır. Burada kemik tümörü ile temas halinde doku sıvısı ve sementten sürekli bir ilaç salınımı oluşmuştur. Aslında, MCF-7 meme kanseri

hücresi üzerindeki biyolojik inhibitör etki giderek azalmış, böylece işlemde ortalama 15 gün sonra silindirlerden salınan doksorubisin ve sisplatin varlığında toksik etki göstermemiştir. Ancak MTX'li grupta varlığında toksik etki oluşturmuş fakat bu ilk gün ki elüsyondan elde edilenden toksik etkiden anlamlı şekilde daha düşük olarak bulunmuş. Her bir ilaç hücre canlılığı üzerinde farklı etki yaratmış ve doksorubisinin kanser hücreleri üzerinde en fazla sitotoksik etkiyi yarattığı bulunmuştur.(95)

Kemik tümörleri ve kemik metastazlarının tedavisinde hidroksi apatit veya akrilik çimentoya mtz, cis diamminedichloroplatinun (CDDP) ve doksorubisin gibi antikanser ilaçların eklenebilmesi ile ilgili yayınlar mevcuttur. 1990 yılında Wu ve ark hidroksiapatitten CDDP ve doksorubisin salındığını ilk defa tanımlamışlardır ve doksorubisin emdirilmiş kemik çimentosu ve seramik implantların sıçan sarkoma modelinde tümör büyümesini süprese ettiğini göstermişlerdir (82).

Takayuki ve arkadaşları doksorubisin üzerine yaptıkları çalışmada doksorubisini CPC ile birleştirerek RMT-1 E4 sıçan meme kanser hücreleri ekilmiş tavşan femur lateral kondillerine uygulamışlar. Doksorubisin CPC ile 1-7 gün inkübasyon sonrası kanser hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı bulunmuş fakat tavşan femurlarının histolojik çalışmalarında medüller kanalda diffüz ödematöz değişiklikler göstermiş ancak kırık veya cilt nekrozu görülmemiştir.(96)

Hidroksiapatit içine antikanser ilaçların yüklendiği ilaç salınım sistemleri ile ilgili çeşitli raporlar yayınlanmıştır. Uchida ve ark. (97) ve Shinto ve ark. (98) hidroksiapatitte CDDP'nin hapis olduğunu yayınlamışlar. Aynı zamanda İtokazu ve ark. (99, 100) santrifüj yöntemleri kullanarak doksorubisin hidroksiapatit bloklarından doksorubisin salınımını yayınlamışlardır. Ortopedik cerrahide kırıklı olgularda CPC geçmişte geniş kullanım alanı bulmuştur. (101, 102)

CPC'nin çeşitli karakterize özellikleri vardır. CPC'nin jel formu kemik defektlerini doldurmak amaçlı küçük bir insizyondan enjekte edilerek kullanılabilir. Yeni kemik oluşumları yavaş yavaş CPC içine nüfuz eder ve sonra yer değiştirir. Oda sıcaklığında kimyasal olarak stabildir. Bu çalışma ışığında doksorubisin ile yüklendiğinde CPC silindirlerinde kompresif güç kaybı olmadığı görülmüştür. doksorubisin CPC'nin defekt doldurucu materyal olarak kullanımı uygun görülmüştür.

Bununla birlikte doksorubisin CPC karışımı etrafındaki kemik formasyonu saf CPC etrafındakine göre daha yavaş olarak bulunmuş. Kontroller ile karşılaştırıldığında implantasyon sonrası birinci haftada doksorubisin CPC karışımı grubunda medüller kanal içerisinde ödematöz değişiklikler gözlenmiş. Dördüncü haftada CPC ile medüller kanal arasındaki hatta yeni kemik oluşumuna bağlı reaktif alanlar gözlenmiş olmasına rağmen doksorubisin CPC karışımı grubunda yaygın fibrosiz ve yeni kemik oluşumuna bağlı küçük bir odak gözlenmiş. Yirmi dördüncü haftada kontrol grubundaki CPC etrafında ve doksorubisin CPC implantları etrafında geniş kemik formasyonları tespit edilmiş. Hidroksiapatit CPC'nin kemik formasyonunu inhibe etmediğini gösteren farklı çalışmalar (103) ışığında medüller kanaldaki bu değişikliğin doksonun sitotoksik etkisine bağlı olabileceği düşünülebilir. Yine aynı çalışmada Doksorubisin CPC silindirlerinin mekanik gücü tek başına CPC den daha düşük olmadığı bulunmuş Doksorubisin ile yüklendiğinde CPC silindirlerinde kompresif güç kaybı olmadığının görülmesi doksorubisin CPC'nin defekt doldurucu materyal olarak kullanımı uygun görülmüştür Bu sonuçlar göstermiş ki doksorubisin CPC maling kemik ve yumuşak doku tümörlerinin tedavisinde etkin olarak kullanılabilir.

Antikanser ilaçların lokal alanlarda salınımı sistemik yan etkileri azaltabilir. Bir taraftan da antikanser ilaçların lokal uygulanması ciltte dahil olmak üzere çevre yumuşak doku üzerinde ciddi hasara sebep olabilmektedir. Bazende ekstrevasyonda bağlı yaygın cilt nekrozları görülebilmektedir. (104)

Rezidüel kanser hücreleri üzerine direkt sitotoksik etki göstermesiyle iskelet neoplazmalarının lokal kontrolünde etkili olabilecek olan akrilik çimentoya kemoterapötik ilaç eklenmesi imkanı yakın geçmişte önerilmiştir.(105).

İnsan meme kanser hücrelerine ait invitro model kullanılarak MTX'in uzun bir zaman zarfında sitotoksik etki gerçekleştirebilecek aktif formunda salındığını tanımlanmış. İlacın farklı konsantrasyonlarda kullanımıyla çimentonun elüsyon kinetiği ve mekanik özellikleri üzerindeki etkileri de ayrıca değerlendirilmiş. Elde edilen sonuçlar MTX salınımının başlangıçta yüksek iken kullanılan ilaç konsantrasyonuna bağlı olarak zamanla azaldığı bulunmuş. Yapılan çalışmanın sonuçlarında ayrıca MTX eklenmesi veya zamanla salınmasıyla çimentonun kompresif özelliklerinde etkilenme olmadığı görülmüştür. Tüm bu bulgular MTX eklenmiş çimento ve uygulamasının

cerrahi küretaj ve yapısal destek amaçlı akrilik çimento implantasyonunda içeren kemik metastaz yönetiminde uygulanabilir olduğunu göstermiştir.

Daha önce farklı antineoplastik ilaçların biyolojik aktif ilaç salınımı sağlamak amacıyla akrilik çimentoya eklenmesi miktarını rapor edilmiş(106). Salınan ilaç miktarı ve salınımın devamlılığı konusundaki en iyi sonuçlar MTX ile elde edilmiştir. Bu da MTX eklenmiş çimentonun iskelet metastazlarının tedavisinde kullanılabilirliği ile ilgili önceki raporları desteklemektedir. Bu çalışmada MTX in farklı konantrasyonlarda kullanılmasıyla ilacın salınımı ve çimentonun fiziksel özellikleri üzerindeki etkileri analiz edilerek geçmiş çalışmalara katkıda bulunulmuş. Ortaya çıkan sonuçlar meme ve diğer çoğu insan kanserinin tedavisinde geniş kullanım alanı bulmuş olan MTX'in akrilik çimento ile karıştırıldığında kanser hücreleri üzerine sitotoksik etki gösterebilen aktif formunda salındığını doğrulamıştır. Ne kadar ortaya çıkan sonuçlar akrilik çimentoya ilaç eklenmesinde iyi mekanik özellikler gösterse de bu konuyla ilgili daha fazla çalışma yapılması gerektiği savunulmuştur. Son olarak yapılan bu çalışmada MTX eklenmesi veya takip eden salınımıyla çimentonun mekanik özellikleri üzerinde bir etkilenme olmadığını ilk defa göstermiştir. Öyle ki kullanılan hiçbir MTX konsantrasyonunda çimentonun kompresif gücü azalmamıştır. Zıt olarak belli bir aralıkta MTX konsantrasyonunda ilaç eklenmesiyle kompresif güçte anlamlı bir artış saptanmıştır. Beklenmedik olmasına karşın bu bulgu şaşırtıcı değildir. Aslında Raimondi ve ark. çimentoya antibiyotik eklenmesiyle kemik çimentosunun kompresif gücünün arttığını gösteren önceki çalışmalarına hemfikirdir(107) . Bu yazarlar bu etkiyi son oluşan materyalin yapısındaki tozların iyi integrasyonuna bağlamıştır ki bu durum MTX'ile de iyi görülebilmektedir.

Zhiping Yang ve ark.(108)MTX ve CPC karışımı üzerine yaptığı bir çalışmada 40 g CPC içerisine en sonda %0 -1 arasında kalacak şekilde 0 ile 400 mg MTX eklenmiş ve böylece MTX CPC örneklerinin invitro ve invivo özellikleri analiz edilmiş. Çalışmada sırasıyla 4 gruba ve 0-80-200 ve 400 mg MTX uygulanmış. Grup A kontrol grubu olarak oluşturulmuş. Başlangıç ve son donma zamanını içeren ölçümlerde MTX seviyesi arttıkça donma zamanında artış olduğu ancak kontrol(A) grubuyla deney (B,C,D) grupları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Dört yüz mg MTX eklenmiş grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MTX CPC'nin kompresif ve tensil güçlerinde

anlamli bir azalma testip edilmiş. Fakat bu azalma her şeye rağmen klinik uygulama için gerekli güçlerin minimum gereksinimleri karşılıyor olarak bulunmuştur. Tarama elektron mikroskopları temel kristal yapısında değişiklik olmadığını göstermiştir bununla beraber MTX CPC'nin invitro ve invivo salım kinetikleri değerlendirildiğinde başlangıçta bir patlama etkisi ve takip eden ani bir düşüş ile salınım sisteminin monolitik bir matriks sistemi olduğuna karar verilmiştir. Bu ilaç salınımı invivo ortamda invitro ortamdaki daha hızlıdır ve MTX 2-4 ay boyunca yüksek bir konsantrasyonda salınabilmektedir. Test edilen en yüksek konsantrasyonlarda bile tavşanda toksik etkiler görülmemiştir.

İnvaziv kemik tümörlerinin çoğu klinik uygulamasında kalsiyum fosfat çimentosu metafizyel kemik defektlerini doldurmak için insan trabeküler kemiği ile direkt temas halinde uygulanmıştır. Bunun için çimentonun gücü en az trabeküler kemiğinki kadar kuvvetli olmalıdır buda yaklaşık 10 MPa kadardır (109, 110). İnvivo olarak MTX CPC örneklerinin kompresif ve tensil güçleri önemli bir rol oynamakta olduğu için tensil güçlerde ayrıca hesaplanmıştır. Yapılan bu çalışmada invitro çalışma sonuçları 40 gr CPC'ye 400 mg kadar MTX eklenmesi ile donma zamanı ve temel kristal yapısına etki olmamakla beraber spesmenin mekanik özellikleri anlamli olarak azaldığını göstermiştir. İnvivo çalışmalarda ise 10 gr semente 100 mg MTX içeren sementler kullanılmış. MTX rapor edilmiş diğer deneylerden daha düşük tutulmuş.(40 g CPC mak 400 mg MTX). Çünkü MTX'in artan düzeyleri kalsiyum fosfat çimentosunun davranışını değiştirebilir ve MTX'in yüksek dozları şiddetli sistemik toksite ve yan etkilerine neden olabilir.

İnvitro ve invivo mtx salınım deneyleri sonucunda MTX CPC başlangıçta bir patlama etkisi gözlenen ve difüzyon ile karakterize monolitik bir matriks sistemidir. İlaçların salınımı toz veya sıvı fazda olması toz/ sıvı oranı, ilağın konsantrasyonu ve çimentonun kalınlığı gibi pek çok faktörden etkilenmiştir.(111, 112). Bu çalışmada toz fazı, sıvı fazı, toz sıvı oranı ve spesmen kalınlığı aynı olarak bulunmuştur. Dolayısıyla çimento içine eklenen MTX miktarı ilaç salınımını etkileyebilecek tek faktör olarak kaldı. Sonuçlar göstermiştir ki ilacın yüksek konsantrasyonlarda kullanılmasıyla salınan günlük konsantrasyon ve salınım sürekliliği artarken günlük salınım yüzdesi azalmaktadır.

İnvivo salınım deneğinde lokal salınım kinetiklerini tanımlayabilmek için kas doku içindeki konsantrasyonu ve implant içindeki, rezüdüel yüzdeyi değerlendirilmiştir. (113) İmplantasyon sonrası 30 günde MTX konsantrasyonu 372 mikrog/ mililitre (yaklaşık 81.86×10^{-8} mol /litre) idi. Buda bilinen minimum etkin konsantrasyonundan (1×10^{-8} mol / litre) daha yüksek bulunmuştur.(114) Bu salınım invitro olarak 2-4 aya invivo olarak 2 aya kadar devam etmiş. Buda ilaç salınım sisteminin uzun dönem etkinliğini göstermiştir. Zhiping Yang ve ark yaptığı bu çalışmada kullanılan konsantrasyonlar gastrointestinal sistem veya yara iyileşmesi üzerine herhangi bir yan etki göstermemiştir. MTX'in büyük kısmı karaciğer ve böbrekte elimine edilmiştir. Buna rağmen bu organların histolojik çalışmalarında MTX CPC implantının deney hayvanları üzerinde belirgin toksitesi olmadığı görülmüştür

Dong Li ve ark. 24 tavşan üzerinde yaptığı farklı bir çalışmada 10 gr CPC tozuna 100 mg MTX eklenmiş. Çalışmada MTX CPC'nin biyoyumluluğu çalışmıştır. Birinci gün, 1,3,6. ayda incelemeler yapılmış. Materyaller iyi tolere edilmiş ve yabancı cisim reaksiyonuna neden olmamış. Farklı çalışmalarda sement yüzeyinde olduğu bildirilen inflamatuvar cevap veya fibröz zarf gibi reaksiyonlar bu çalışmada görülmemiştir. Bu çalışmada x-ray ve histolojik kesitler hem CPC hemde MTX CPC'nin osteogenez ve biyoçözünabilir özellikte olduğunu göstermiştir. Yeni kemik oluşumu, implant materyalinin ufalanma ile çözünme (creeping substitution) süreciyle rezorpsiyonu sırasında senkronize olarak görülmüştür. Materyal hacmindeki azalmayla periferden merkeze doğru yeni kemik oluşumu belirlemiştir. Osteoklast benzeri hücreler sement çözünmesine cevap olarak ortaya çıkar.(115). Bu hücrelerin kalsiyum fosfat partiküllerini fagositoz kapasiteleri invivo ve invitro olarak tanımlanmıştır.(116,117-119). Erken evrede osteoklastlar CPC üzerinde kümeleşmiş ve migre olacak osteoblastlar için yer açmışlardır. Rezorpsiyon alanının kenarlarında yeni oluşmuş kemik matriksi bulunmuş ve kenarlardan rezorsiyon alanı içine büyümeye devam etmiştir

Geç evrede (implantasyon sonrası 3 ve 6. aylarda) kemikleşme süreci osteoblast ve osteoklastların zamanla artmasıyla olmuştur. Rezorpsiyon ve osteogenez süreci osteoblast ve osteoklastların artan seviyeleri ile paralellik göstermiştir. Orijinal kortikal kemik duvarı ile yeni kemik arasında kaynama görülmüş ve yeni oluşan kemiğin

rezüdiel materyal ile direkt temas halinde olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar hücresel içerikli materyal rezorpsiyonu ile yeni kemik oluşumunun kemik tamirinde önemli rol oynadığını göstermiştir ki bu bulgu çoğu çalışmalarda aynı fikirdedir. (117, 118, 120)

İmplantasyondan 1 ay sonra yeni kemik oluşum hacmi yüzdesi , osteoblast ve osteoklast indeksi kontrol CPC grubunda MTX CPC grubuna göre anlamlı şekilde yüksekti. Yine 3 ayda CPC ve MTX CPC gruplarındaki osteoklast sayısı anlamlı olarak farklıydı. İnvivo ve invitro MTX salınımı ile ilgili yapılan önceki çalışmalarda (95) MTX CPC sisteminin difüzyon ve başlangıçta ortaya çıkan bir patlama etkisiyle monolitik bir matriks sistemi olduğunu göstermişti. MTX'in lokal konsantrasyonları birinci günde 4.57 iken 15 günde 1.13 $\mu\text{g} / \text{ml}$ olarak ölçüldü. Takiben MTX deneyin sonlandırıldığı 30'ü güne kadar yavaş bir hızla sürekli olarak salınmıştır(30. gündeki MTX konst. Yaklaşık 0.37 $\mu\text{g} / \text{ml}$) 30 gündeki konsantrasyonu baz alarak salınımın 2-4 ay boyunca devam edebileceğini öngörebiliriz. Sonuçlar 0.82 ve 10.06 $\mu\text{mol} / \text{L}$ konsantrasyonlarındaki MTX salınımının osteogenez üzerine inhibitör etkisi olduğunu gösterir. Bu da CPC ve MTX CPC implant gruplarındaki 3 aydaki osteoblast ve osteoklast sayıları ve yeni kemik alanındaki farklılıkları açıklayabilir.

Hem CPC hemde MTX CPC implantların biyocözünebilir ve osteokondüktif özellikleri vardır. Bununla birlikte implantasyon sonrası başlangıç periyodunda MTX salınımı osteogenezi inhibe edebilir. Biz bu inhibisyonun progresif olarak güçsüzleştiğini ve 6 ayda CPC ve MTX CPC grupları arasında herhangi bir fark olmadığını gösterilmiştir. Sonuç olarak MTX CPC invaziv kemik tm lerini lokal kontrolünde etkin bir ilaç sistemi ve defektleri doldurmada mükemmel bir materyel olabilecek olduğu yapılan çalışmalarla gösteriştir.

Bizim yaptığımız çalışma MTX ile uygulanan CPC'nin lokal yara iyileşmesi üzerine etkisinin araştırıldığı ilk çalışma olmakla birlikte MTX'li çimento etrafına kollagen membran uygulanarak MTX'in lokal antiinflamatuvar yan etkilerini önlenip önlenemediği araştırılmıştır.

Sonuç olarak CPC MTX üzerine kollejen membran uygulanması, doku iyileşmesi üzerine negatif etkileri ortadan kaldırıp, pozitif etki yaptığını bulduk. Sadece MTX veya membran uygulanmasında bu etki yoktur. Bu da CPC'ye eklenmiş MTX ve

membranın doku iyileşmesi açısından birbirinin negatif ya da indeferans etkilerini ortadan kaldırıp, pozitif etki ile sonuçlandığını saptadık. Bu alanda ileri çalışmaların yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Ooms E M *et al* 2003 Soft-tissue response to injectable calcium phosphate cements *Biomaterials* 24 749–57
2. Li D X *et al* 2007 Controllable release of salmon-calcitonin in injectable calcium phosphate cement modified by chitosan oligosaccharide and collagen polypeptide *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 18 2225–31
3. Bohner M *et al* 1997 Gentamicin-loaded hydraulic calcium phosphate bone cement as antibiotic delivery system *J. Pharm. Sci.* 86 565–72
4. Hunt T, Wound Healing. *Current Surgical Diagnosis & Treatment*'de. Ed: Way LW, Doherty GM. United States of America : McGraw Hill, 2004:75-88.
5. Townsend CM, Beauchamp DR, Evers MB, Mattox KL. *Sabiston textbook of surgery: the biological basis of modern surgical practice.* Philadelphia: Elsevier Saunders;2004.
6. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol. Rev.* 2003;83:835–870.
7. Lineaweaver WC, Lei MP, Mustain W, Oswald TM, ve ark. Vascular EndotheliumGrowth Factor, Surgical Delay, and Skin Flap Survival. *Ann Surg.* 2004 June;239(6): 866–875.
8. Eanes, E.D., Termine, J.D. and Posner, A.S. (1967) *Clin. Orthop. Rel. Res.*, 53: 223-35.
9. Robinson, R.A. and Watson, M.L. (1955) *Ann. NY Acad. Sci.*, 60: 596-628.
10. Kartsogiannis, V. *et al.* (2004) *Mol. Cell. Endocrinol.*, 228: 79-102.
11. Schilling, A.F. *et al.* (2004) *Biomaterials*, 25: 3963-3972.

12. Kalteis, T. et al.(2004) *Z. Orthop. Grenzgeb.*, 142: 666-72 ve Ruiz, D.S. et al.(1999) *Bone*, 25: 85S-90S.
13. Alberts, B. et al. (2002) *Molecular biology of the cell. Garland Science*, s. 1306.
14. Taş, A.C. et al. (1999) *J. Eur. Ceram. Soc.*, 19: 2573-79; Türk Patent Enstitüsü, Patent No: TR99-00037
15. Fogueri, L.R. and Singh, S. (2009) Smart polymers for controlled delivery of proteins and peptides: a review of patents. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* 3, 40–48
16. Quintanar-Guerrero, D. et al. (2009) Silica xerogels as pharmaceutical drug carriers.*Expert Opin. Drug Deliv.* 6, 485–498
17. Rush, S.M. (2005) Bone graft substitutes: osteobiologics. *Clin. Podiatr. Med. Surg.* 22,619–630
18. Lee, S.H. (2007) Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 30, 339–359
19. Gauthier, O. et al. (1998) Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials* 19, 133–139
20. Brown, W.E. and Chow, L.C. (1986) Effects of neutral salts in a bench-scale caries model. *J. Dent. Res.* 65, 1115–1120
22. Sugawara, A. et al. (2004) Histopathological and cell enzyme studies of calcium phosphate cements. *Dent. Mater. J.* 23, 613–620
24. Smartt, J.M., Jr et al. (2005) Repair of the immature and mature craniofacial skeleton with a carbonated calcium phosphate cement: assessment of biocompatibility, osteoconductivity, and remodeling capacity. *Plast. Reconstr. Surg.* 115, 1642–1650
25. Ginebra, M.P. et al. (2006) Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review. *J. Control. Release* 113, 102–110
26. Kanczler, J.M. and Oreffo, R.O. (2008) Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur. Cell. Mater.* 15, 100–114

27. Josse, S. et al. (2004) An innovative strategy for local treatment of bone resorption and prevention of osteoporotic fractures. *Adv. Mater.* 16, 1423–1427
28. Josse, S. et al. (2005) Novel biomaterials for bisphosphonate delivery. *Biomaterials* 26, 2073–2080
29. Roussie`re, H. et al. (2008) Reaction of zoledronate with b-tricalcium phosphate for the design of potential drug device combined systems. *Chem. Mater.* 20, 182–191
30. Seshima, H. et al. (2006) Control of bisphosphonate release using hydroxyapatite granules. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 78, 215–221
31. Boanini, E. et al. (2008) Alendronate-hydroxyapatite nanocomposites and their interaction with osteoclasts and osteoblast-like cells. *Biomaterials* 29, 790–796
32. Panzavolta, S. et al. (2009) Alendronate and pamidronate calcium phosphate bone cements: setting properties and in vitro response of osteoblast and osteoclast cells. *J. Inorg. Biochem.* 103, 101–106
33. Wang, C.J. et al. (2002) The often poor clinical outcome of infected total knee arthroplasty. *J. Arthroplasty* 17, 608–614
34. Sudo, A. et al. (2008) Treatment of infected hip arthroplasty with antibiotic impregnated calcium hydroxyapatite. *J. Arthroplasty* 23, 145–150
35. Parvizi, J. et al. (2008) Efficacy of antibiotic-impregnated cement in total hip replacement. *Acta Orthop.* 79, 335–341
36. Joseph, T.N. et al. (2003) Use of antibiotic-impregnated cement in total joint arthroplasty. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* 11, 38–47
37. Bacci, G. et al. (2003) Nonmetastatic osteosarcoma of the extremity with pathologic fracture at presentation: local and systemic control by amputation or limb salvage after preoperative chemotherapy. *Acta Orthop. Scand.* 74, 449–454
38. Turcotte, R.E. et al. (2002) Giant cell tumor of long bone: a Canadian Sarcoma Group study. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 248–258
39. Ersoy Y. Metotreksat ve diğ er toksik ilaclar. Goksoy T. Romatizmal hastalıkların tanı ve tedavisi, I. Baskı 2002; 907-26

40. Van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, De Abreu RA, van de Putte LB. Methotrexate in rheumatoid arthritis: an update with focus on mechanisms involved in toxicity. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 27:277-292, 1998.
41. Rubino FM. Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. *J Chromatogr B Biomed Sci* 764(1-2):217-54, 2001.
42. Chabner BA, Allegra A, Curt C. Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? *J Clin Invest* 76:907-912, 1985
43. Miketova P, Kaemingk K, Hockenberry M et al. Oxidative changes in cerebral spinal fluid phosphatidylcholine during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Biol Res Nurs* 6:187-95, 2005.
44. Kishi T, Tanaka Y, Ueda K. Evidence for hypomethylation in two children with acute lymphoblastic leukemia and leukoencephalopathy. *Cancer* 89:925-931, 2000
45. Hirata S, Matsubara T, Saura R, Tateisbi H, Hirohata K. Inhibition of in vitro vascular endothelial cell proliferation and in vivo neovascularization by lowdose methotrexate. *Arthritis Rheum* 32:1065-73, 1989
46. Kimura E, Nishimura K, Sakata K, Oga S, Kashiwagi K, Igarashi K. Methotrexate differentially affects growth of suspension and adherent cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36(5):814-25,2004.
47. Kane D, Gogarty M, O'leary J, Silva I, Bermingham N, Bresnihan B, Fitzgerald O. Reduction of synovial sublining layer inflammation and proinflammatory cytokine expression in psoriatic arthritis treated with methotrexate. *Arthritis Rheum.* 50(10):3286-95, 2004.
48. Cronstein BN. Molecular therapeutics. Methotrexate and its mechanism of action. *Arthritis Rheum* 39:1951-1960, 1996
49. Kremer JM, Galivan J, Streckfuss A. Methotrexate metabolism analysis in blood and liver of rheumatoid arthritis patients: Association with hepatic folate deficiency and formation of polyglutamates. *Arthritis Rheum* 29:832-835,

- 1986.
50. Baggott JE, Morgan SL, Ha TS, Alargon GS, Kopman WJ, Krumdieck CL. Antifolates in rheumatoid arthritis: A hypothetical mechanism of action. *Clin Exp Rheum* 11 (8):101-105, 1993.
 51. Ersoy Y. Metotreksat ve diğer toksik ilaçlar. Goksoy T. Romatizmal hastalıkların tanive tedavisi, I. Baskı 2002; 210-36
 52. American College of Rheumatology Subcomiittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines. Guidelines for the management of Rheumatoid Arthritis 2002 *Arthritis Rheumatol* 2002; 46: 328-46
 53. James R. O'Dell, MD. Methotrexate use in rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin N Amer* 1997; 23: 779-96
 54. Weinblatt ME. Methotrexate.In: William N Kelley et al. Textbook of Rheumatology 1993 767-778
 55. Alponat A, Lakshminarasappa SR, Teh M. Effects of physical barriers in prevention of adhesions: An incisionel hernia model in rats. *J Surg Res* 1997; 68: 126-132.
 56. Alponat A, Lakshminarasappa SR, Yavuz N. Prevention of adhesions by seprafilm, an absorbable adhesion barrier: An incisionel hernia model in rats. *Am Surg* 1997; 63: 818-819.
 57. Reijnen MM, Meis JF, Postma VA. Prevention of intraabdominal abscesses and adhesions using a hyaluronic acid solution in a rat peritonitis model. *Arch Surg* 1999; 134: 997- 1001.
 58. Suzuki Y, Yamaguchi T. Effects of hyaluronic acid on macrophage phagocytosis and active axygen release. *Agents Actions* 1993; 38: 32- 37.
 59. Urman B, Victor G, Jetha N. Effect of hyaluronik acit on postoperative intraperitoneal adhesion formation in the rat model. *Fertil. Steril.*1991; 56:563-567.

60. Becker JM, Dayton MT, Fazio VW. Prevention of postoperative abdominal adhesions by a sodium hyaluronate-based bioresorbable membrane: a prospective, randomized, double blind, multicenter study. *J Am Coll Surg* 1996; 183:297-306.
61. Buckenmaier CC, Pusateri AE, Haris RA. Comparison of antiadhesive treatments using an object rat model. *Am Surg* 1999; 65: 274-282.
62. Harris ES, Morgan RF, Rodeheaver GT. Analysis of the kinetics of peritoneal adhesions formation in the rat and evaluation of potential antiadhesive agents.
63. Heidrick GW, Pippit CH, MorgamMA. Efficacy of intraperitoneal sodium carboxymethylcellulose in preventing postoperative adhesion formation. *J Reprod Med* 1994; 39:575-578.
64. Hemadeh O, Chilukuri S, Bonet V. Prevention of peritoneal adhesions by administration of sodium carboxymethylcellulose and oral vitamin E. *Surgery* 1993; 114: 907- 910.
65. Franklin RR. Reduction of ovarian adhesions by the use of Interceed. Ovarian adhesion Study Grup. *Obstet Gynecol* 1995; 86: 335-340.
66. Diamond MP, Linsky CB, Cunningham T. A model of sidewall adhesions in the rabbit: Reduction by an absorbable barrier. *Microsurgery* 1987; 8: 197-200.
67. Diamond MP, Linsky CB, Cunningham T. Synergistic effects of Interceed (TC7) absorbable barrier. *Infertil Reprod Med Clin North Am* 1994; 5: 485-508
68. Haney AF, Hesla J, Hurst BS, Expanded polytetrafluoroethylene (Gore-TexSurgical Membrane) is superior to oxidized regenerated cellulose (InterceedTC+7) in preventing adhesions. *Fertil Steril* 1995; 63 1021- 1026.
69. Haney AF, Doty E. Expanded- polytetrafluoroethylene but not oxidizedregenerated cellulose, prevents adhesion formation and reformation in a Mouse uterine horn model of surgical injury. *Fertil Steril* 1993; 60: 550- 558
70. Ellis H. The cause and prevention of postoperative intraperitoneal adhesions. *Surg Gynecol Obstet* 1971;133: 497- 511.

71. Ellis H. Acute intestinal obstruction. In: Seymour I. Schwartz and Harold Ellis, Maingot's Abdominal Operation. D. Appleton- Century Com. 1990; Vol: 905-932.
72. Gilmore OJA, Reid C. : Prevention of peritoneal adhesions in the rats by a new povidoneiodine (PVP) solution. J Surg Res 1978; 25:477-481.
73. Haney AF, Doty E. Murine peritoneal injury and de novo adhesion formation aused by oxidized- regenerated cellulose (Interceed [TC7] but not expanded polytetrafluoroethylene (Gore- Tex Surgical Membrane). Fertil Steril 1992; 57: 202- 208.
74. Hernigou PH, Thiery JP, Benoit J, Voisin, Leroux P, Hagege G, Delepine G, Goutallier D (1989) Methotrexate diffusion from acrylic cement. J Bone Joint Surg [Br] 71:804–811
75. Hernigou P, Brun B, Astier A, Goutallier D, le Bourgeois JP. Diffusion of methotrexate from surgical acrylic cement. In: Humphrey GB, ed. *Osteosarcoma in adolescent and young adults*. Boston: Kluwer Academic Publisher, 1993:231-3.
76. Langlais L, Bunnetel L, Cormier M, Segui A, Cement pharmacokinetic taux osseux Rev Chir Orthop 1988;74:493-503
77. Julia A, Lebugle A, Rodriguez F, Rouffiac F. Etude comparative d'un biomateriau (implant) "a base de phosphate octocalcique. APGI 1989;4:369–75.
78. Lebugle A, Julia A, Rodriguez F, Bonneville P. Materiau implantable biodegradable et procede de fabrication. Brevet europeen et internationalise, 1989
79. Lasserre V. Etude de la fixation d'un anticancereux sur un phosphate de calcium en vue de l'elaboration de m!edicaments implantables. Dipl#ome dEtudes Approfondies Sciences des Materiaux, INPT, Toulouse, 1992.
80. Foch P. Mise au point d'une preparation injectable de m!ethotrexate "a support phosphate de calcium en vue d'une experiementation animale. Internal Report, University Paul Sabatier, Toulouse, 1993.

81. Trilecant M, Guicheux J, Grimandi G, Leroy M, Daculsi G. Dynamic compaction: a new process to compact therapeutic agent-loaded calcium phosphates. *Biomaterials* 1997;18(2):141
82. Xingguo Cheng and Liisa Kuhn Chemotherapy drug delivery from calcium phosphate nanoparticles
83. Barroug A, Kuhn LT, Gerstenfeld LC, et al. Interactions of cisplatin with calcium phosphate nanoparticles: in vitro controlled adsorption and release. *Journal of Orthopaedic Research*.2004;22:703–8
84. Galasko CSB. The pathological basis for skeletal scintigraphy. *J Bone Joint Surg [Br]* 1975;57-B:353-9.
85. Enneking WF, Flynn L. Effects of VX-2 carcinoma implanted in bone in rabbits. *Cancer Res* 1968;28:1007-13.
86. H. M. Wang, S. Crank, G. Oliver, C. S. B. Galasko The Effect Of Methotrexate-Loaded Bone Cement On Local Destruction By The Vx2 Tumour *J Bone Joint Surg [Br]* 1996;78 B:14-17. Received 28 April 1995; Accepted 21 June 1995
87. Wu Yg, Wang Ty, Ma Yz And Sun Sz: Experimental Research On The Use Of Antineoplastic Drug With A Bone Implant. *Int Orthop* : 387-391, 1990
88. Yg, Wang Ty, Ma Yz, Sun Sz. Experimental Research On The Use Of Antineoplastic Drug With A Bone Implant. *Int Orthop* 1990;14:387-91.
89. Marco A.Lopez-Heredia, G.J. Bernard Kamphuis, Peter C. Thüne. An injectable calcium phosphate cement for the local delivery of paclitaxel to bone *Biomaterials*32(2011)541
90. ZhouQ, ChingAK, LeungWK, SzetoCY, HoSM, ChanPK, etal. Novel therapeutic potential in targeting microtubules by nanoparticlealbumin- bound paclitaxel in hepatocellularcarcinoma.*IntJOncol*2011;38(3):721
91. BohnerM, GbureckU, BarraletJE. Technological issues for the development of cient calciumphosphate bone cements: a critical assessment. *Biomaterials* 2005;26(33):6423

92. Lopez Heredia MA, Bohner M, Zhou W, Winnubst AJA, Wolke JGC, Jansen JA. The effect of ball milling grinding pathways on the bulk and reactivity properties of calcium phosphate cements. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, in press.
93. Lebugle A, Rodrigues A, Bonneville P, Voigt JJ, Canal P, Rodriguez F. Study of implantable calcium phosphate systems for the slow release of methotrexate. *Biomaterials* 2002;23(16):3517e22.
94. Abe T, Sakane M, Ikoma T, Kobayashi M, Nakamura S, Ochiai N. Intraosseous delivery of paclitaxel-loaded hydroxyapatite-alginate composite beads delaying paralysis caused by metastatic spine cancer in rats. *J Neurosurg Spine* 2008;9(5): 502e10.
95. M. A. Rosa, G. Maccauro, A. Sgambato, R. Ardito, G. Falcone, V. De Santis, Acrylic Cement Added With Antiblastics In The Treatment Of Bone Metastases Ultrastructural And In Vitro Analysis *British Editorial Society Of Bone And Joint Surgery* 2003
96. Takayuki Tanı, Kyoji Okada, Shu Takahashi, Norio Suzuki, Yoichi Shimada And Eiji Itoı Doxorubicin-Loaded Calcium Phosphate Cement In The Management Of Bone And Soft Tissue Tumors : 55-60(2006)
97. Uchida A, Shinto Y, Araki N and Ono K: Slow release of anticancer drugs from porous calcium hydroxyapatite ceramic. *J Orthop Res* 10: 440-445, 1992.
98. Shinto Y, Uchida A, Korkusuz F, Araki N and Ono K: Calcium hydroxyapatite ceramic used as a delivery system for antibiotics. *J Bone Joint Surg* 74-B: 600-604, 1992.
99. Itokazu M, Matsunaga T, Kumazawa S and Yang W: A novel drug delivery system for osteomyelitis using porous hydroxyapatite blocks loaded by centrifugation. *J Appl Biomater* 6: 167-160, 1995.
100. Itokazu M, Kumazawa S, Wada E and Yang W: Sustained release of adriamycin from implanted hydroxyapatite blocks for the treatment of experimental osteogenic sarcoma in mice. *Cancer Lett* 107: 11-18, 1996.

101. Mattsson P, Alberts A, Dahlberg G, Sohlman M, Hyldahl HC and Larsson S: Resorbable cement for the augmentation of internally-fixed unstable trochanteric fractures. A prospective, randomised multicentre study. *J Bone Joint Surg 87-B*: 1203- 1209, 2005.
102. Provenzano MJ, Murphy KP and Riley LH: Bone cements: review of their physiochemical and biochemical properties in percutaneous vertebroplasty. *Am J Neuroradiol 25*: 1286-1290,2004.
103. Tahara Y and Ishii Y: Apatite cement containing cisdiamminedichloroplatinum implanted in rabbit femur for sustained release of the anticancer drug and bone formation. *J Orthop Sci 6*: 556-565, 2001.
104. Rudolph R, Stein R and Pattillo Ra: Skin Ulcers Due To Adriamycin. *Cancer 38*: 1087-1094, 1976.
105. F. Greco, I. De palma, n. Specchia, s. Jacobelli and c. Gaggini, *orthopaedics 15* (1992) 189
106. M. A. Rosa, G. Maccauro, A. Sgambato, R. Ardito, G. Falcone, v. De santis and F. Muratori, *J Bone Joint Surg. 85–B* (2003) 712
107. M. T. Raimondi, T. Villa and R. Pietrabissa, Mechanical Properties of Acrylic Bone Cement. In *Bone Cement And Cemented Fixation of Implants 40 Years Of Clinical Practice And Prospective for the future* Pipino F Ed (2001) pp. 31–40
108. Zhiping Yang, MD; Dong Li, MD; Jian Han, MS; Jianmin Li, MD; Xin Li, MD; Zhenfeng Li, MD; Shuhong Li, MD Incorporation of Methotrexate in Calcium Phosphate Cement: Behavior and Release in Vitro and in Vivo 109. Fernandez E, Ginebra MP, Bermudez O, Boltong MG, Driessens FCM, Planell JA. *J Mater Sci Lett.* 1995; 14:4.
110. Ginebra MP, Fernández E, Boltong MG, Bermúdez O, Planell JA, Driessens FC. Compliance of an apatitic calcium phosphate cement with the short-term clinical requirements in bone surgery, orthopaedics and dentistry. *Clin Mater.* 1994; 17(2):99

111. Daculsi G, LeGeros RZ, Nery E, Lynch K, Kerebel B. Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: Ultrastructural and physiochemical characterization. *J Biomed Mater Res.* 1989; 23(8):883-894.
112. Otsuka M, Matsuda Y, Suwa Y, Fox JL, Higuchi WI. A novel skeletal drug-delivery system using self-setting calcium phosphate cement. 5. Drug release behavior from a heterogeneous drug-loaded cement containing an anticancer drug. *J Pharm Sci.* 1994; 83(11):1565-1568.
113. Lebugle A, Rodrigues A, Bonneville P, Voigt JJ, Canal P, Rodriguez F. Study of implantable calcium phosphate systems for the slow release of methotrexate. *Biomaterials.* 2002; 23(16):3517-3522.
114. Chabner BA, Young RC. Threshold methotrexate concentration for in vivo inhibition of DNA synthesis in normal and tumorous target tissues. *J Clin Invest.* 1973; 52(8):1804-1811
115. Chazono M *et al* 2004 Bone formation and bioresorption after implantation of injectable beta-tricalcium phosphate granules–hyaluronate complex in rabbit bone defects *J. Biomed. Mater. Res. A* 70A 542–9
116. Constantz B R *et al* 1998 Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate cements in different rabbit osseous sites *J. Biomed. Mater. Res.* 43 451–61
117. Malard O *et al* 1999 Influence of biphasic calcium phosphate granulometry on bone ingrowth, ceramic resorption, and inflammatory reactions: preliminary *in vitro* and *in vivo* study *J. Biomed. Mater. Res.* 46 103–11
118. Lu J *et al* 2002 The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone *J. Biomed. Mater. Res.* 63 408–12
119. Pioletti D P *et al* 2000 The effects of calcium phosphate cement particles on osteoblast functions *Biomaterials* 21 1103–14
120. Lu J X *et al* 1998 Comparative study of tissue reactions to calcium phosphate ceramics among cancellous, cortical, and medullar bone sites in rabbits *J. Biomed. Mater. Res.* 42 357–67