

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI



TAVŞANDA FEMUR BAŞI OSTEONEKROZ MODELİNDE
TADALAFİLİN KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ

UZMANLIK TEZİ
DR. EMRE ÖZMEN

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. AHMET SALDUZ

İSTANBUL – 2021

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI



TAVŞANDA FEMUR BAŞI OSTEONEKROZ MODELİNDE
TADALAFİLİN KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ

UZMANLIK TEZİ
DR. EMRE ÖZMEN

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. AHMET SALDUZ

İSTANBUL – 2021

BEYAN

Bu tez çalışmasının tamamı şahsıma aittir. Tezin planlanmasından yazım aşamasına kadar bütün aşamalarda etik dışı hiçbir yaklaşımım bulunmamaktadır. Tez yazımı sırasında çok sayıda kaynaktan yararlanılmış ve yararlanılan tüm kaynaklar “Referanslar” bölümünde eksiksiz olarak şahsım tarafından belirtilmiştir. Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje numarası: 36145). Yazım sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın bulunmadığını beyan ederim.

Dr. Emre Özmen

TEŞEKKÜR

Ortopedi ve Travmatoloji ihtisasına başladığım ilk günden itibaren ve tüm ihtisasım süresince mesleki bilgi ve becerimin gelişmesinde emeği olan hocalarıma, beni destekleyen, bir aile ortamında hissetmemi sağlayan asistan arkadaşlarıma, Anabilim dalımızın tüm hemşire, sekreter, personellerine ve hiçbir zaman desteğini esirgemeyen Anabilim dalı başkanımız, saygıdeğer hocam Prof. Dr. Hayati DURMAZ'a,

Uzmanlık eğitimim içerisinde çalışma imkânı bulduğum, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan emekli öğretim üyeleri sayın Prof. Dr. Mehmet ÇAKMAK, Prof. Dr. Önder YAZICIOĞLU, Prof. Dr. Harzem ÖZGER, Prof. Dr. Yener TEMELLİ, Prof. Dr. İrfan ÖZTÜRK, Prof. Dr. Levent ERALP ve Prof. Dr. Ata Can ATALAR'a,

Asistanlığım süresince beraber çalıştığım, beni yetiştiren değerli hocalarım Prof. Dr. Mehmet AŞIK, Prof. Dr. Cengiz ŞEN, Prof. Dr. Önder KILIÇOĞLU, Doç. Dr. Fuat BİLGİLİ, Doç. Dr. Turgut AKGÜL, Doç. Dr. Halil İbrahim BALCI, Doç. Dr. Ali ERŞEN, Doç. Dr. Gökhan POLAT ve Doç. Dr. Ömer Naci ERGİN hocalarıma teşekkür ederim.

Beraber çalışmaya başladığımız günden itibaren eğitimim için her türlü desteği veren Op. Dr. Yavuz SAĞLAM,

Eğitimime yaptıkları tüm katkılar sebebiyle ağabeylerim Op. Dr. Ömer AYIK, Op. Dr. Taha KIZILKURT, Op. Dr. Murat KORKMAZ, ve Op. Dr. Serkan BAYRAM'a saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın her aşamasında bilgi, deneyim ve ilgisini hiçbir zaman eksik etmeyen, asistanlık hayatıma başladığım ilk günden itibaren yardımlarını esirgemeyen, tezimin hazırlanmasında yol gösteren, ortopedi ve travmatolojinin tüm konularında ve özellikle tümör cerrahisi konusunda deneyimlerini ve bilgisini paylaşan değerli ağabeyim ve tez hocam Doç. Dr. Ahmet SALDUZ'a,

Tezimin ilgili kısımlarında benden vaktini, yardımlarını ve çok değerli tecrübelerini esirgemeyen Prof. Dr. M. Bilge BİLGİÇ ve Prof. Dr. Memduh DURSUN hocalarıma ve onların nezdinde Patoloji ve Radyoloji Anabilim dallarının emeği geçen tüm çalışanlarına,

Tezime yapmış olduğu tüm katkılar ve emekleri dolayısıyla Arş. Gör. Sezen ATASOY'a,

Deneysel aşamalarda yardımlarını ve vakitlerini esirgemeyen Dr. Taha Furkan YAĞCI, Dr. Yaşar Samet GÖKÇEOĞLU, ve Dr. Onur KUTLU'ya,

Beni hep destekleyen ve her açıdan kendime örnek aldığım anne ve babama,
Tanıştığımız günden itibaren hep yanımda olan hayat arkadaşım, biricik eşim Dr. Hazal İzol ÖZMEN'e tez sürecindeki yardımları için sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Emre Özmen



İÇİNDEKİLER

BEYAN	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
RESİMLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ	ix
KISALTMALAR LİSTESİ.....	x
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ.....	3
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1 Proksimal femur ve kalça eklem anatomisi.....	5
2.2 Tavşanlarda proksimal femur anatomisi ve radyolojisi	12
2.3 Femur başı osteonekrozu	18
2.4 Femur başı osteonekrozunda hayvan modelleri.....	37
2.5 NO-cGMP sistemi ve fosfodiesteraz inhibitörleri	41
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	44
4. BULGULAR.....	50
5. TARTIŞMA	54
6. ÇIKARIMLAR VE ÖNERİLER.....	59
7. ÖZGEÇMİŞ.....	60
8. KAYNAKLAR	61

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Pelvis ve proksimal femurun anteriordan görünüşü ve önemli anatomik yapılar.....	5
Şekil 2: Proksimal femurun anterior, superior ve posteriordan görünüşü ve önemli anatomik yapılar	6
Şekil 3: Kalça eklemi etrafındaki ligamentöz yapılar	7
Şekil 4: Femur başının kanlanması bilgisayarla oluşturulmuş görüntüsü	8
Şekil 5: Tavşan proksimal femurunun etrafındaki vasküler yapıları (A) anterior ve (B) posteriordan gösteren diyagram	14
Şekil 6: Osteonekroza sebep olan farklı çevresel ve genetik faktörlerin muhtemel etki mekanizması	24
Şekil 7: Steroid ilişkili osteonekrozun muhtemel patofizyolojisi	27
Şekil 8: Çalışma yönteminin şeması	45
Şekil 9: VEGF ekspresyonu analizi.....	53
Şekil 10: Tavşanlarda steroid ilişkili osteonekrozun patofizyolojisi	58

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1: Kadavra disseksiyonu sırasında sol kalçanın posteriordan görünümü	10
Resim 2: Aksiyel BT kesitinde (1) posterior inferior nutrient arter (2) MFCA'nın derin dalı (3) femur boynunun anterior nutrient arteri	11
Resim 3: Tavşan proksimal femurunun anteriordan, medialden ve posteriordan görünümü.....	12
Resim 4: Tavşan femurundaki önemli anatomik yapılar.....	13
Resim 5: Tavşan proksimal femurunun dekalsifikasyon sonrası midkoronal kesiti.....	13
Resim 6: Tavşan sağ femurunun (A) AP ve (B) lateral grafisi.....	14
Resim 7: Tavşan kalçasının (A) koronal, (B) sagittal ve (C) aksiyel MR görüntüleri.....	15
Resim 8: Normal tavşan kemik iliği.....	15
Resim 9: Normal tavşan kemik iliği.....	16
Resim 10: Normal tavşan femur başı ve boynu	16
Resim 11: Tavşan femur başı kırıkdağı ve subkondral alan.....	17
Resim 12: Normal trabeküler yapı	17
Resim 13: Sol kalça ileri evre idiopatik avasküler nekroz tanılı hastanın kalça AP grafisi.....	21
Resim 14: Farklı Arlet ve Durroux osteonekroz evrelerinin histolojileri.....	23
Resim 15: FBON tanılı hastanın sol kalça frog leg grafisi.....	29
Resim 16: İntravenöz lipopolisakkarit uygulaması için marjinal kulak veninden damar yolu açılması	44
Resim 17: Kıl testere ile femur başı midkoronal hattın ikiye ayrıldıktan sonra makroskopik görünüm.....	45
Resim 18: Mide lavajı ile tadalafıl çözeltisinin verilmesi	46
Resim 19: Laemmlı buffer ile hazırlanan örneklerin dikey elektroforezde yürütülmesi	48
Resim 20: G1 ve G2'den farklı Arlet-Durroux evrelerini gösteren görüntüler	50
Resim 21: Metafiz ve subkondral alanlarda nekroz görüntüsü.....	51
Resim 22: Eklem için efüzyon olmayan (A) ve olan (B) iki tavşanın koronal T2 MR kesiti	52
Resim 23: Üç farklı tavşana ait MR kesitleri.....	52

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: Osteonekroz için risk faktörleri.....	20
Tablo 2: Arlet ve Durroux osteonekroz sınıflandırması.....	23
Tablo 3: Farklı sınıflamaların literatürde kullanım sıklığı	30
Tablo 4: Literatürde farklı tedavilerin kanıt düzeyi	36
Tablo 5: Sadece kortikosteroid ile oluşturulmuş tavşan FBON modelleri.....	39
Tablo 6: LPS veya LPS-KS kombinasyonu ile oluşturulmuş tavşan FBON modelleri *	41
Tablo 7: MR’da saptanan ve histolojik olarak doğrulanan lezyonların dağılımı.....	52

KISALTMALAR LİSTESİ

ON: Osteonekroz

FBON: Femur Başı Osteonekrozu

SİON: Steroid İlişkili Osteonekroz

eNOS: Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz

NO: Nitrik Oksit

GS: Guanilil Siklaz

cGMP: Siklik Guanozin Monofosfat

ARCO: Association Research Circulation Osseous

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

BT: Bilgisayarlı Tomografi

PET: Pozitron Emisyon Tomografisi

MP: Metilprednizolon Sodyum Süksinat

ESWT: Ekstrakorporeal Şok Dalga Tedavisi

MCFA: Medial Sirkumfleks Femoral Arter

LCFA: Lateral Sirkumfleks Femoral Arter

IGA: İnférieur Gluteal Arter

ÖZET

Giriş: Çocuk ve genç erişkin hastalarda, yüksek doz steroid tedavisi gerektiren çocukluk çağı maligniteleri veya romatolojik hastalıklar sonrası gelişen femur başı osteonekrozu ciddi bir problem teşkil etmektedir. Literatürde bu hasta grubu için geçerliliği kanıtlanmış bir profilaksi bulunmamaktadır. Fosfodiesteraz inhibitörleri, etki mekanizmaları sebebiyle profilaksi ve tedavide kullanım potansiyeline sahiptirler. Biz, tavşanlarda yüksek doz kortikosteroid ve lipopolisakkarid kullanarak oluşturduğumuz osteonekroz modelinde, profilaktik tadalafil kullanımının etkilerini radyolojik, histopatolojik ve moleküler biyolojik yöntemlerle incelemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: 24 adet Yeni Zellanda tavşanı üç gruba ayrıldı. 8 tanesi kontrol grubu (G0) yapılarak herhangi bir işlem yapılmadı. Birinci gruptaki (G1) tavşanlara 0.1 mg/kg E.coli lipopolisakkaridi (LPS) intravenöz olarak verildi. Ardından aynı gün başlamak üzere, üç gün üst üste 40 mg/kg metilprednizolon sodyum süksinat (MP) intramüsküler (IM) olarak uygulandı. İkinci gruptaki (G2) tavşanlara önce on gün boyunca 5 mg/kg tadalafil oral olarak verildi. Tadalafil tedavisinin sekizinci gününde bu gruptaki tavşanlara da G1'deki tavşanlar gibi 0.1 mg/kg LPS verildikten sonra aynı gün başlamak üzere üç gün boyunca günlük 40 mg/kg IM MP uygulaması yapıldı. Son MP uygulamasından üç hafta sonra tüm hayvanlar sakrifiye edildi. Manyetik rezonans görüntüleme (MR) yapıldıktan sonra femurlar çıkartılıp, femur başlarının yarısında VEGF ekspresyonu çalışıldı. Kalan kısımlarda osteonekroz açısından histopatolojik inceleme yapıldı.

Bulgular: G1'de 8 tavşanın 16 kalçasından 15'inde (%93) nekroz görüldü. Buna karşılık G2'de 6 tavşanın 12 kalçasından 8'inde (%67) nekroz görüldü ($p>0.05$). G2 grubunda VEGF protein ekspresyon seviyelerinin kontrol ve G1 grubuna göre anlamlı bir şekilde yükseldiği görüldü (sırasıyla $p<0.05$ ve $p<0.0004$) G0 ve G1 arasında VEGF ekspresyonu açısından anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$).

Çıkarımlar: Lipopolisakkarid ve kortikosteroid kombinasyonu ile tavşanlarda çok yüksek oranda osteonekroz oluşturulabilmiştir. Profilaktik olarak verilen tadalafil bu modelde osteonekroz oranını anlamlı olarak azaltmamıştır. Buna karşılık, tadalafilin, steroid ve lipopolisakkarit etkisinden bağımsız olarak femur başında VEGF ekspresyonunu arttırdığı görülmüştür.

Anahtar kelimeler: steroid ilişkili osteonekroz, profilaksi, tavşan osteonekroz modeli, lipopolisakkarid, vasküler endotelial büyüme faktörü, fosfodiesteraz inhibitörleri, tadalafil

ABSTRACT

Introduction: Femoral head osteonecrosis secondary to high dose steroid use for childhood malignancies or rheumatological diseases in the pediatric and adolescent population is a serious problem. Currently, there are no evidence-based prophylactic methods in the literature for these patients. Phosphodiesterase inhibitors have the potential to be used in prophylaxis and treatment due to their mechanism of action. We aimed to assess the radiological, histopathological, and molecular biologic effects of prophylactic tadalafil use in a rabbit femoral osteonecrosis model using high dose corticosteroids and lipopolysaccharide.

Material and method: 24 New Zealand rabbits were divided into three equal groups. 8 were designated as the control group (G0) and no further intervention was made. Rabbits in group 1 (G1) received 0.1 mg/kg E. coli lipopolysaccharide (LPS) intravenously. Then starting on the same day, 40 mg/kg methylprednisolone sodium succinate (MP) was given intramuscularly (IM) for three days consecutively. Rabbits in group 2 (G2) were given 5 mg/kg tadalafil orally for ten consecutive days. Starting on the eighth day, 0.1 mg/kg LPS was given followed by three days of 40 mg/kg MP injections as in rabbits in G1. All animals were sacrificed 3 weeks after the final MP injection. Magnetic resonance imaging (MRI) was performed and bilateral femora were harvested. Halves of the femoral heads were saved for VEGF examination with Western blot analysis. The remaining parts were examined histopathologically for the presence of osteonecrosis.

Results: In G1, 15 out of 16 hips (93%) of 8 rabbits had osteonecrosis compared to 8 out of 12 hips (67%) of 6 rabbits in G2 ($p>0.05$). VEGF expression in G2 was significantly higher than G0 and G1 ($p<0.05$ and $p<0.0004$, respectively). VEGF expression was not significantly different between G0 and G1.

Conclusions: Lipopolysaccharide and corticosteroid combination achieved a very high rate of osteonecrosis in the rabbits. Prophylactic tadalafil use did not decrease the occurrence of osteonecrosis significantly. On the other hand, it increased VEGF expression in the femoral head significantly, independent from the effects of steroids and lipopolysaccharide.

Keywords: steroid-induced osteonecrosis, prophylaxis, rabbit osteonecrosis model, lipopolysaccharide, vascular endothelial growth factor, phosphodiesterase inhibitors, tadalafil

1. GİRİŞ

Femur başı osteonekrozu (FBON), genel ortopedi pratiğinde oldukça sık karşılan bir patolojidir. Farklı etiyolojiler zemininde oluşabilen bu patoloji, orta yaşlı ve yaşlı hastalarda başta artroplasti olmak üzere farklı yöntemlerle tedavi edilmektedir. Ne var ki, FBON sadece bu yaş grubunda görülmemektedir. Özellikle çocuk ve genç erişkin hastalarda gelişen FBON hem ortopedist hem de hasta için ciddi bir problem teşkil etmektedir. Dejeneratif artritin geliştiği vakalarda sıklıkla hem tedaviyi üstlenen ortopedist, hem de hasta, ağrı ve sosyal hayatın kısıtlanması ile öngörülen ömrü kısalmış ve komplikasyon riski artmış bir total kalça protezi ameliyatı arasında karar vermek zorunda kalmaktadır.

Literatüre ve klinik uygulamalara baktığımızda, cerrahi tedavide son 50 yılda başta artroplasti olmak üzere anlamlı gelişmeler olmakla beraber, konservatif tedavide ve profilakside aynı başarının sağlanamamış olduğunu görmekteyiz. FBON pek çok etiyoloji zemininde gelişebileceği için tüm hasta grubu için tek bir profilaktik yöntem aramanın etkin bir yaklaşım olmayacağını düşündük. Çalışmamızın ana fikri, çocukluk çağı lenfoması geçirdikten sonra aldığı yüksek doz steroid tedavisi sebebiyle bilateral FBON ve denejeratif artrit gelişen genç bir hastamızın tedavi sürecinde ortaya çıkmıştı. Dolayısıyla profilaksiye yönelik yapacağımız bu çalışmada kortikosteroid zemininde gelişen osteonekrozu hedef aldık. Yüksek doz steroid tedavisi zemininde gelişen steroid-ilişkili osteonekrozun (SİON), diğer etiyolojilere göre birtakım önemli farklılıkları mevcuttur. Bunlardan en önemlisi, SİON'un, travmatik veya idiyopatik ON'nin aksine öngörülebilir ve önlem alınabilir olmasıdır. Öte yandan bazı genetik hastalıklar ve diğer spesifik hastalıklar zemininde gelişen FBON'lar dikkate alındığında insidansı çok daha yüksektir. Dolayısıyla, bu sorunun çözülmesinde elde edilebilecek bilgilerin hastaların tedavisine somut katkılarda bulunabileceğini düşünüyoruz.

Hasta grubumuzu yeterince daralttıktan sonra ikinci önemli aşama, soruna uygun bir çözüm geliştirebilmek için hastalığın patogenezeine ilişkin güncel literatürü tarayarak detaylı bir şekilde incelemek oldu. Bu aşamada SİON ile ilgili iki önemli sorunun mevcut olduğunu görüyoruz. Bunlardan ilki ve en önemlisi, SİON'un güvenilir bir hayvan modelinin tanımlanamamış olmasıdır. Bazı araştırmacıların sadece steroid vererek tatmin edici ON oranları saptadıklarını bildirmiş olmalarına karşın, aynı yöntemle yaptığımız ön çalışmalarda, bu modelin oluşturulmaya çalışıldığı deney hayvanlarında benzer sonuçlara ulaşamadık. Bu konuyu tartışma kısmında daha detaylı ele

alacağız. Bu nedenle literatürde yine sıkça uygulanmış olan bir başka yöntem olan steroid ve bakteriyel lipopolisakkaridin birlikte kullanıldığı bir modeli uyguladık. Bu yöntem sadece kortikosteroid kullanımına göre daha başarılı olarak bildirilmiştir. Güvenilir ve tekrarlanabilir hayvan modeli olmamasıyla kısmen bağlantılı olarak, SİON'un patogenezinin tam olarak aydınlatılamamış olması ikinci önemli problemdir. Bugüne kadar denenmiş profilaktik ve medikal yöntemlerin yetersizliğini göz önüne aldığımızda, ileri sürülen farklı mekanizmaların hiçbirinin, tek başlarına, SİON'un patogenezi tüm boyutlarıyla açıklayamadığını düşünmek mantıksız olmayacaktır.

Profilaksi için hangi yöntemi kullanacağımıza karar vermek için literatürü incelediğimizde varsayılan patogenetik mekanizmayı hedefleyen bazı ilaçların sıklıkla denenmiş olduğunu görüyoruz. Bunların çoğu, bu mekanizmaya tek bir noktadan müdahale eden girişimlerdir. Fosfodiesteraz inhibitörlerinin bu noktada diğer profilaktik ajanlardan ayrışabileceğini düşünüyoruz. Genetik çalışmalar VEGF ekspresyonunun azalmasının osteonekroz için risk faktörü olduğunu göstermektedir (1). Aynı zamanda endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) aktivitesinin az olması da bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır (2). Fosfodiesteraz inhibitörlerinin hem akut olarak NO seviyesini arttırarak koruyucu olabileceğini, aynı zamanda VEGF ekspresyonu üzerinden anjiyogenezi destekleyerek tamir mekanizmasının daha etkin çalışmasını sağlayabileceğini düşündük. Tadalafilin oral kullanılabilmesi, kolay ulaşılabilmesi ve yan etki profilinin iyi bilinir ve kabul edilebilir olması da, literatürde profilaksi amacıyla denenmiş bazı ilaçlara göre ciddi bir avantajdır.

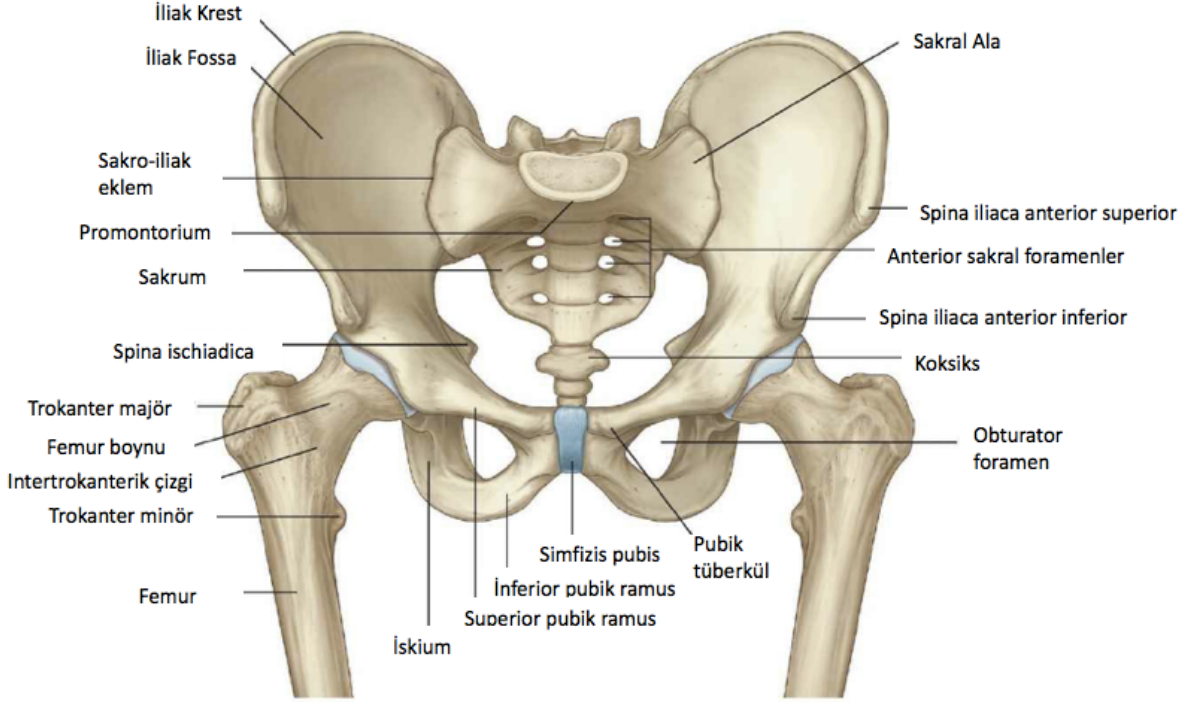
Özetle, SİON patogenezi aynı anda farklı noktalardan müdahale edebileceğini öngördüğümüz için, fosfodiesteraz inhibitörlerinden tadalafili profilaksi yöntemimiz olarak kullanmayı seçtik. Bu sayede tavşanlarda yüksek doz kortikosteroid ve lipopolisakkarit kullanarak oluşturduğumuz osteonekroz modelinde tadalafilin koruyucu olup olmadığını ve femur başında nasıl değişikliklere yol açtığını radyolojik, histopatolojik ve moleküler biyolojik yöntemlerle incelemeyi amaçladık.

Çalışmamızın, özellikle çocukluk çağı maligniteleri veya romatolojik hastalıklar için yüksek doz kortikosteroid alması planlanan hastalarda, bu yıkıcı komplikasyonunun önlenmesine yönelik literatürdeki mevcut eksikliği giderme konusunda katkı yapacağını umut ediyoruz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Proksimal femur ve kalça eklem anatomisi

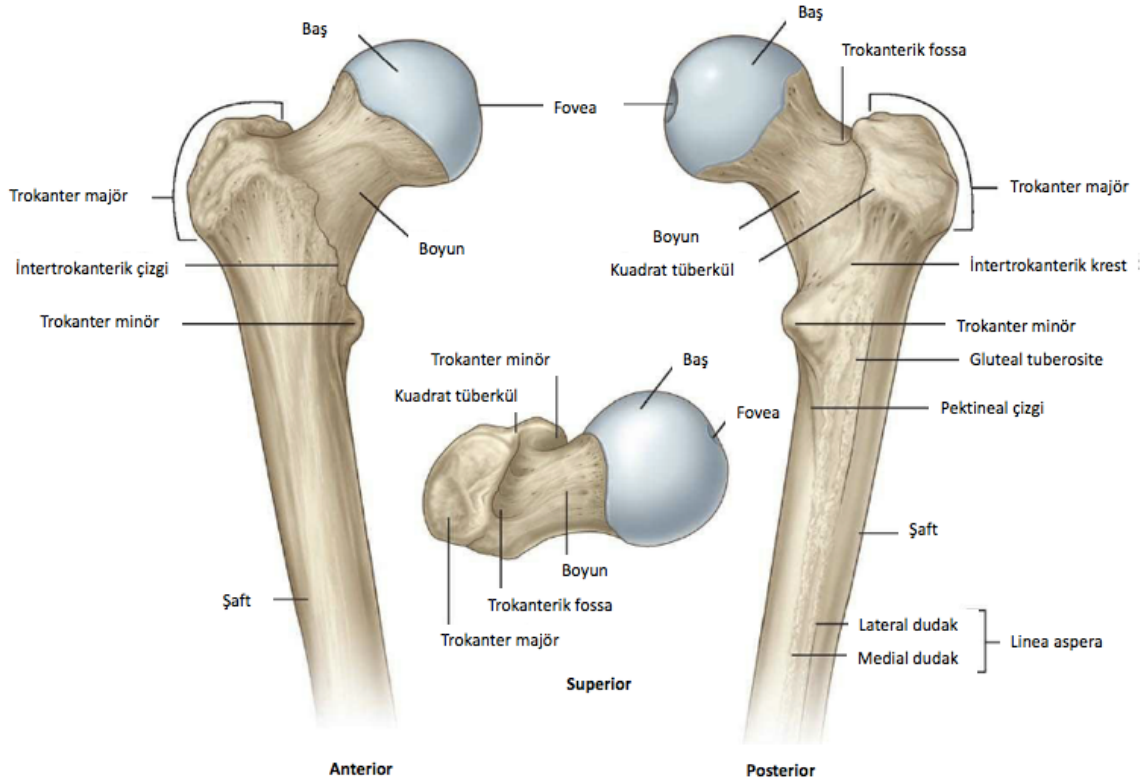
Kalça eklemi insan vücudundaki en büyük sferoid eklemdir. Femur başı ve asetabulumdan oluşur. Vücut ağırlığının pelvisten alt ekstremitelere iletilmesini sağlar. Kalça ekleminin sferoid yapısı fleksiyon-ekstansiyon, iç-dış rotasyon ve abdüksiyon-addüksiyon olmak üzere birbirine dik üç aksta harekete izin verir. Asetabulum gelişimsel olarak ilium, pubis ve iskium kemiklerinin birleşmesi ile oluşur. Pelvis ve proksimal femurdaki önemli anatomik yapılar Şekil 1’de gösterilmiştir (3).



Şekil 1: Pelvis ve proksimal femurun anteriordan görünüşü ve önemli anatomik yapılar (3)

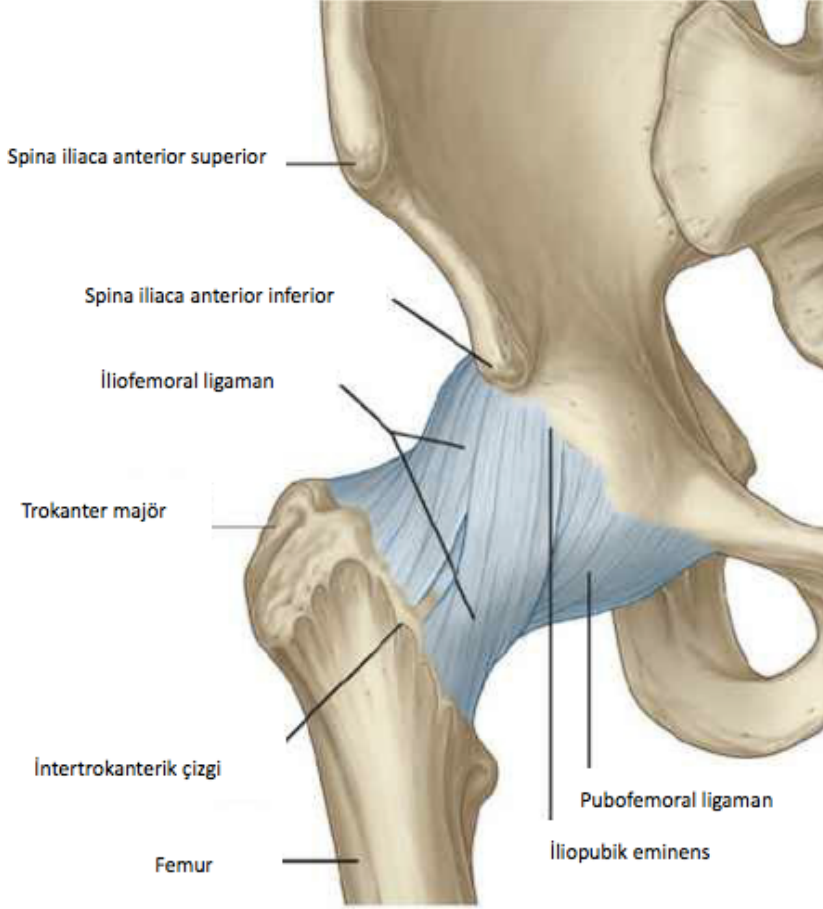
Proksimal femuru oluşturan başlıca anatomik yapılar femur başı, boynu, trokanter majör ve trokanter minördür. Femur başında fovea capitis olarak adlandırılan küçük bir çukur bulunmaktadır. Bu çukura ligamentum teres yapışır ve içinden foveal arter geçer. Femur başı kıkırdak ile kaplıdır ve asetabulum ile eklemler. Şekil 2’de proksimal femurun farklı açılardan önemli anatomik yapıları gösterilmiştir (3).

Femur başı ve intertrokanterik alanı bağlayan bölüme femur boynu veya collum femoris denir. İntertrokanterik bölge femurun trokanter majör ve minörü ile bunların arasında kalan kısma verilen isimdir. Femur boynu ve shaft arasında iki önemli açı bulunmaktadır. Bunlardan biri koronal planda olan shaft-boyun açısıdır ve normalde ortalama yaklaşık 125-130 derecedir. Aksiyel planda bakıldığında ise femur boynunun distalde femoral kondillerle yaptığı açıya anteversiyon açısı denir. Yetişkinde anteversiyon açısı yaklaşık 10-15 derecedir. Sagittal eksenden bakıldığında da öne eğilme (anterior bowing) mevcuttur.



Şekil 2: Proksimal femurun anterior, superior ve posteriordan görünüşü ve önemli anatomik yapılar (3)

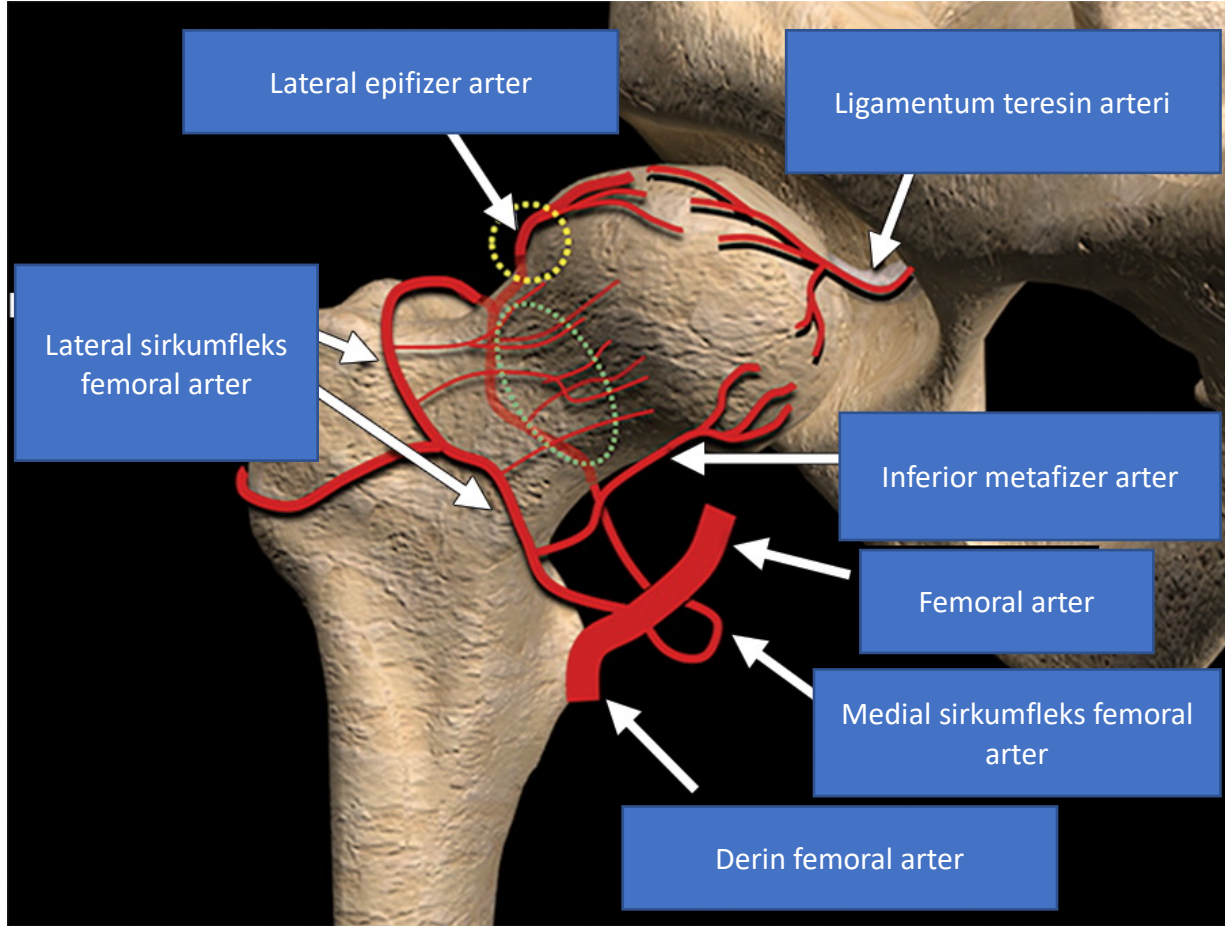
Asetabulumun kenarında yer alan ve halka şeklinde bir fibrokartilaj yapıda olan labrum, asetabulumu derinleştirir ve stabiliteye katkıda bulunur. Eklem kapsülü son derece sıkı ve sağlamdır. Etrafındaki en güçlüsü iliofemoral bağ olmak üzere çeşitli bağlar eklem kapsülünü güçlendirir (Şekil 3).



Şekil 3: Kalça eklemi etrafındaki ligamentöz yapılar (3)

Femur başının kanlanması ilk olarak Hunter tarafından incelenmiş olup; Hunter, femur boynunun bazisindeki damarsal halkayı ‘circulus articuli vasculosus’ olarak isimlendirmiştir (4). Bu tarihten itibaren hem disseksiyonlarla hem de anjiyografik çalışmalarla femur başının kanlanması daha detaylı olarak ortaya konulmuştur.

Femur başı ve boynunun kanlanmasının üç ana komponenti vardır. Literatüre baktığımızda bu komponentlerin farklı araştırmacılar tarafından farklı şekilde isimlendirilmiş olduğunu görüyoruz. Bu farklılık ön planda nutrient (besleyici) arterlerin isimlendirmesindeki farklılıktan kaynaklanmaktadır. Trueta ve ark., femur başını besleyen damarları gelişimsel süreçteki anatomik bölümlere istinaden epifizer ve metafizer arterler olarak adlandırmıştır (5). Bu isimlendirmeye göre femur başının kanlanması Sheehan ve ark.'dan adapte edilen Şekil 4'te gösterilmiştir (6).



Şekil 4: Femur başının kanlanmasının bilgisayarla oluşturulmuş görüntüsü. Yeşil halka asendan retiküler dalların intrakapsüler olduğu geçiş bölgesini, sarı halka femur baş-boyun bileşkesindeki kırıklarda kanlanmanın etkilenme riskinin yüksek olduğu hassas bölgeyi göstermektedir.

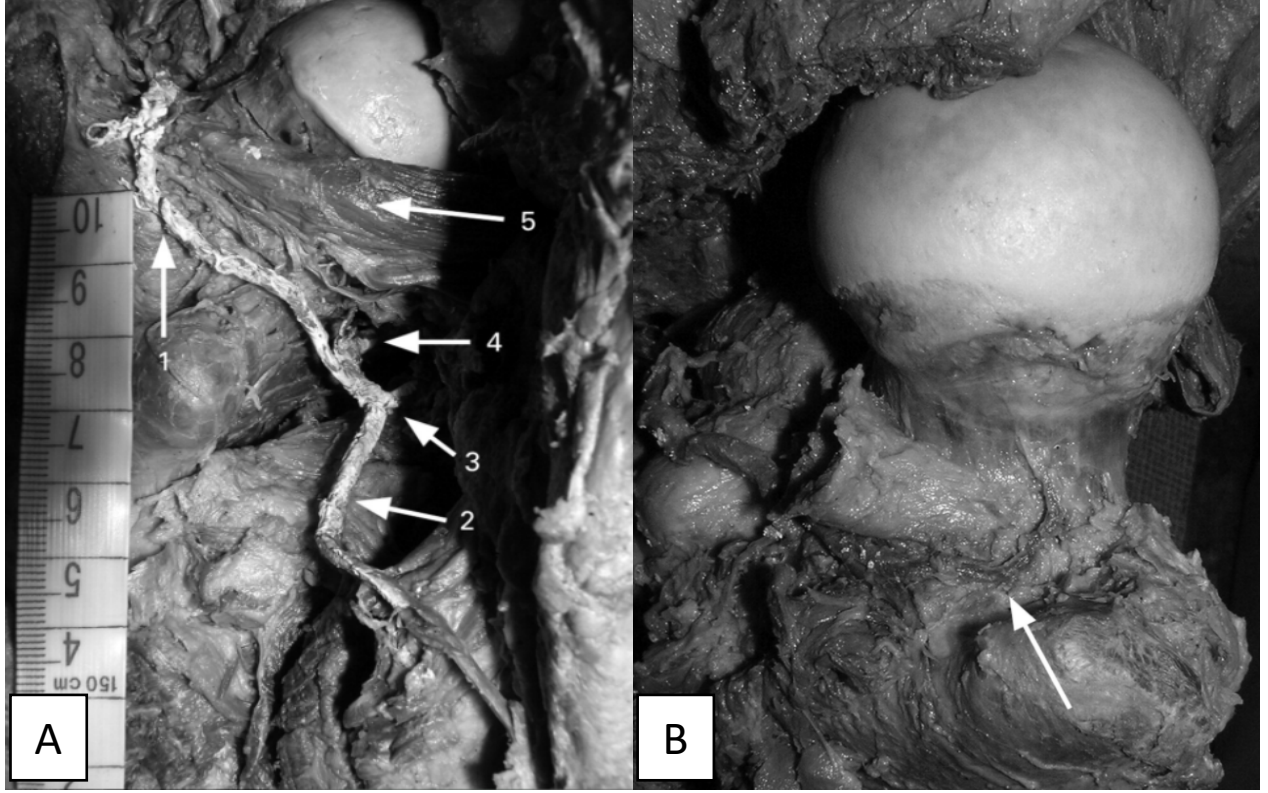
Crock ve Chung bu damarları ekstrakapsüler ve intrakapsüler damarlar ile ligamentum teresin arteri olarak isimlendirmiştir (7,8). Bazı yazarlar nutrient damarları retinaküler arterler olarak tanımlamışlardır (9). Bu isimlendirme sistemini kullanan literatür femur başının kanlanmasını (1) anteriorda lateral sirkumfleks femoral arter (LCFA) ve posteriorda medial sirkumfleks femoral arterden (MCFA) gelen dallardan oluşan ekstrakapsüler arteriyel halka, (2) retinaküler arterler olarak da bilinen, ekstrakapsüler halkanın çıkan intrakapsüler servikal dalları ve (3) obturator arterden köken alan ligamentum teresin arteri olarak gruplamışlardır (6,10) İsimlendirmede bir başka farklılık gösteren nokta MCFA ve inferior gluteal arter (IGA) arasında mevcut olan anastomozdur. Bu anastomozu oluşturan dala IGA'nın terminal dalı (11) veya piriformis dalı (9) denmiştir. Biz Zlotowicz ve ark.'nın önerdiği şekilde (12), femur başının kanlanmasını tarif ederken nutrient arterleri posterior superior, posterior inferior ve anterior olarak, IGA'nın MCFA ile anastomoz yapan dalını ise piriformis dalı olarak isimlendireceğiz.

Femur başı esas olarak MFCA tarafından beslenir. Beslenmeye katkıda bulunan diğer arterler ise LFCA, obturator arter, superior gluteal arter ve derin femoral arterin ilk perforan dalıdır. Pek çok yazar femur başını besleyen damarları üç ana grupta değerlendirmektedir. Bunlar MFCA'nın derin dalından çıkan posterior superior nutrient arterler, MFCA'nın ana trunkusundan çıkan posterior inferior nutrient arter ve IGA'nın piriformis dalıdır (7-9,13-16).

MFCA genellikle derin femoral arterden köken alır. Posteriordan gelerek trokanter minörün anteriorunda posterior inferior nutrient (inferior metafizer arter olarak da bilinir) dalını verir (Resim 1 ve 2) (17) . Bu dalı verdikten sonra ana trunkus inen dal ve derin dal olmak üzere ikiye ayrılır (16). Derin dal proksimale doğru devam ederek quadratus femoris ve obturator eksternus kasları arasında yer alır. Devamında bu dal IGA'nın piriformis dalı ile anastomoz yapar. Daha sonra kraniyale doğru devam ederek eklem içine girer ve intraartiküler seyri sırasında 1-5 adet posterior superior nutrient artere bölünür. Posterior superior nutrient arterlerin en önemli kan akımı kaynağı olduğu bildirilmiştir; öyle ki, başka herhangi bir damarın katkısı olmaksızın femur başını tek başlarına besleyebilirler (18).

Femur başı kanlanmasındaki en dikkat çekici özelliklerden biri, çocuklukta ve yetişkinlikte farklı olmasıdır. Bir çalışmada 16-29. intrauterin haftalarda fetüslerin yarısından fazlasında femur başını besleyen dominant dalın IGA olduğu bildirilmiştir (11). Pediatrik yaş grubunda femur başı kanlanmasında en önemli kaynak obturator arterden köken alan, ve ligamentum teresle yol alarak

foveadan femur başına giren ligamentum teresin arteridir (19).Yetişkinde ise bu arter önemini yitirir ve yerini ön planda MFCA alır.



Resim 1: Kadavra diseksiyonu sırasında sol kalçanın posteriordan görünümü. 1=MFCA'nın derin dalı 2=MFCA'nın desendan dalı 3=MFCA'nın bifurkasyonu 4=Posterior inferior nutrient arter 5=Obturator externus kası. B. Sağ kalçanın kadavra diseksiyonu sırasında posteriordan görünümü. Beyaz ok MFCA'nın terminal dalı olan posterior superior nutrient arteri göstermektedir. Resimler Zlotorowicz ve ark.'dan alınmıştır (17)

MCFA'daki kan akımı travma veya başka sebeplerle bozulursa femur başında iskemi gelişebilir (20). Şekil 4'te görüleceği üzere, lateral epifizer damarlar femur baş-boyun bileşkesinin lateral kenarından girdiği için, bu alanı içeren kırıklar kanlanmayı bozma açısından ciddi risk taşımaktadır (21).



Resim 2: Aksiyel BT kesitinde (1) posterior inferior nutrient arter (2) MFCA'nın derin dalı (3) femur boynunun anterior nutrient arteri. Resim Zlotowicz ve ark.'dan alınmıştır (17).

2.2 Tavşanlarda proksimal femur anatomisi ve radyolojisi

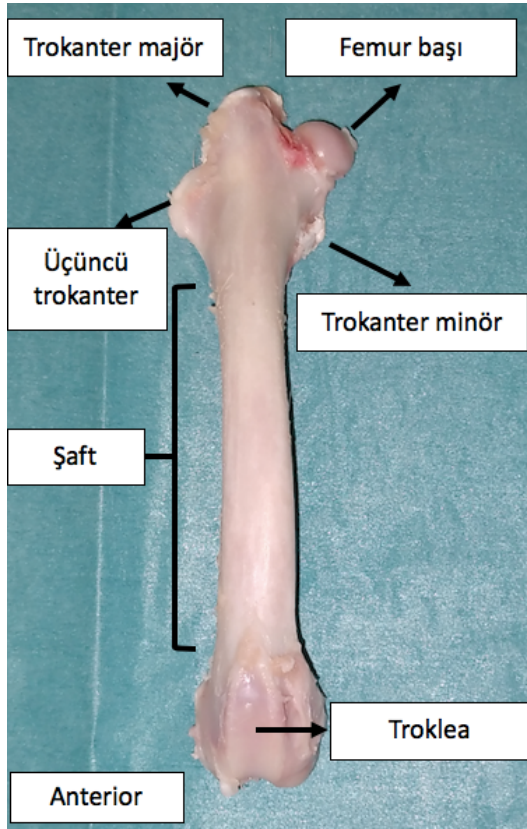
Tavşanlarda proksimal femur anatomisi insanlarınkine benzer olsa da birtakım önemli farklılıklar bulunmaktadır. Tavşanlarda femur boynu çok daha kısa olup femur boynunda az miktarda trabeküler kemik vardır (22). Trokanterik fossaları, insanlarınkine göre nispeten büyük ve derindir. Trokanterik fossaya gemellus minimus, gemellus cranialis, obturator internus, obturator eksternus kasları yapışır. Trokanterik fossa MR görüntülemelerde osteonekroz veya kist gibi kemik lezyonları ile karışabilir (23). Aynı şekilde histopatolojik koronal kesitlerde de kemiğe yapışan bağ dokular sebebiyle nekroz sahası ile karışabilir.

Brookes ve ark. yaptıkları anatomik disseksiyonlarla tavşanlarda femur başı kanlanması insanlarınkine oldukça benzer olduğunu göstermiştir (24) (Şekil 5). Dikkat çekici farklardan biri tavşanlarda derin femoral arterin olmamasıdır. Bunun yerine MFCA, femoral arterin medial kısmından çıkmaktadır (24–26).

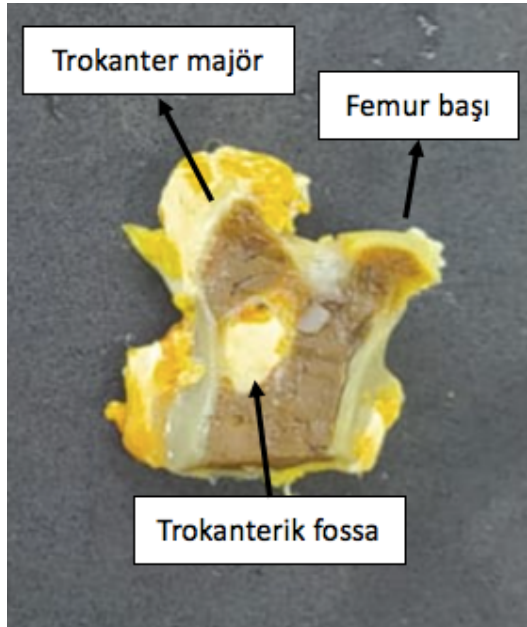
Tavşan femurunun anterior, medial ve posteriordan görünümü Resim 3'te; önemli anatomik yapılar Resim 4'te; dekalsifikasyon sonrası midkoronal makroskopik kesiti Resim 5'te; AP ve lateral grafilere Resim 6'da; kalça ekleminin aksiyel, sagittal ve koronal MR kesitleri Resim 7'de gösterilmiştir.



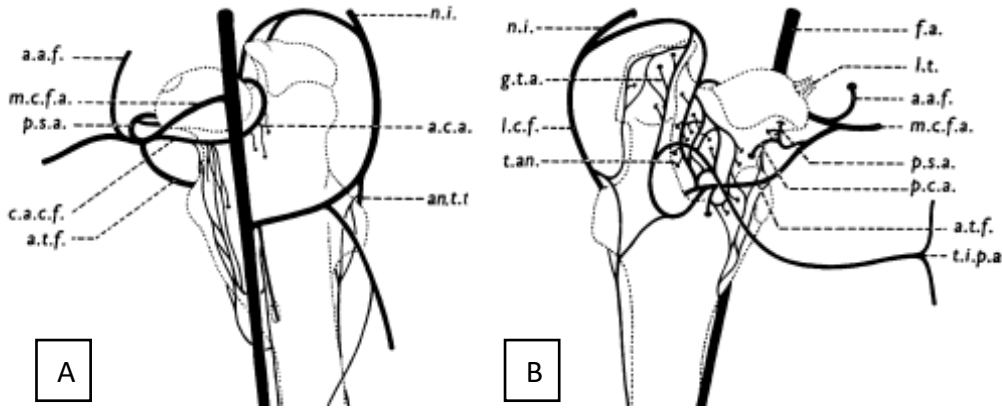
Resim 3: Tavşan proksimal femurunun anteriordan, medialden ve posteriordan görünümü



Resim 4: Tavşan femurundaki önemli anatomik yapılar



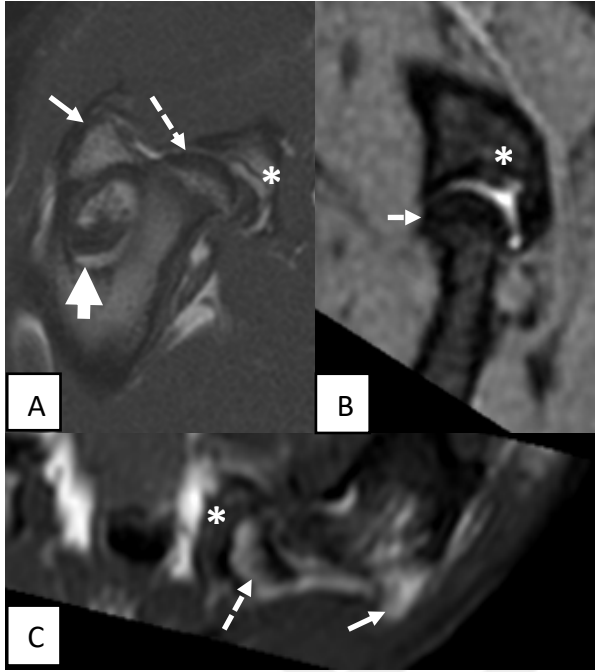
Resim 5: Tavşan proksimal femurunun dekalsifikasyon sonrası midkoronal kesiti



Şekil 5: Tavşan proksimal femurunun etrafındaki vasküler yapıları (A) anterior ve (B) posteriordan gösteren diyagram. Brookes ve ark.'dan adapte edilmiştir. a.a.f=asetabular fossanın arteri, a.c.a.=anterior servikal arterler, a.t.f=trokanterik fossanın arteri, ant.t=üçüncü trokanter çevresindeki anastomoz, c.a.c.f=circulus arteriosus capitis femoris, f.a.=femoral arter, g.t.a=trokanter majörün arterleri, l.c.f=lateral sirkumfleks femoral arter, l.t=ligamentum teres, m.c.f.a=medial sirkumfleks femoral arter, n=nutrient arter, p.c.a=posterior servikal arterler p.s.a=posterior subkapital arter, t.an=trokanterik anastomoz t.i.p.a= internal iliak arterin trokanterik dalı

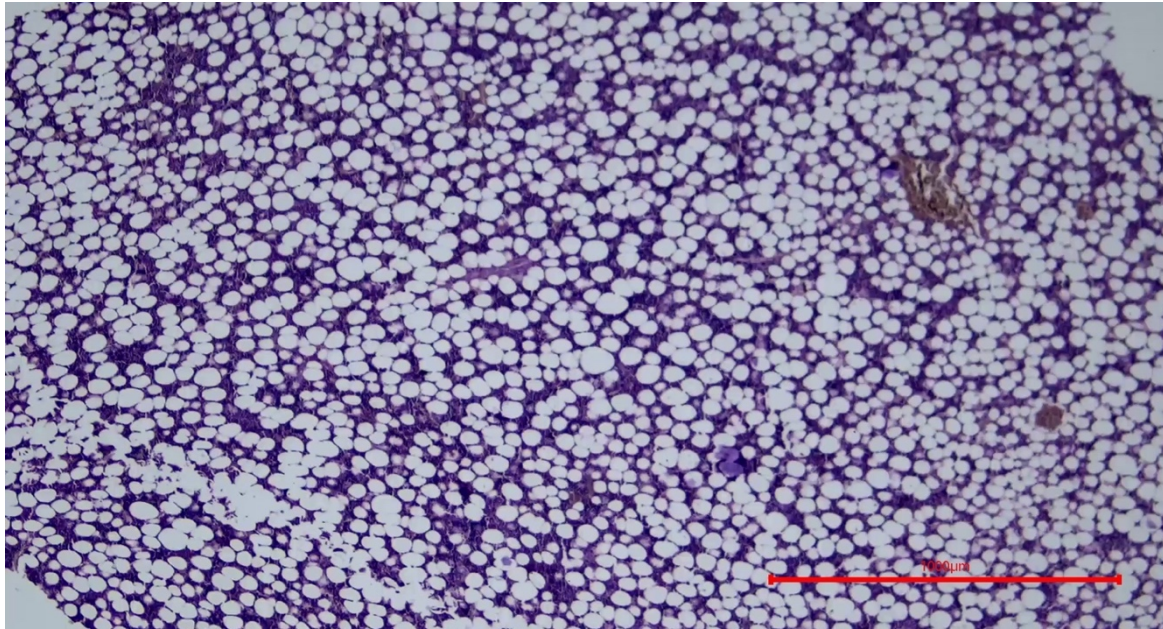


Resim 6: Tavşan sağ femurunun (A) AP ve (B) lateral grafisi

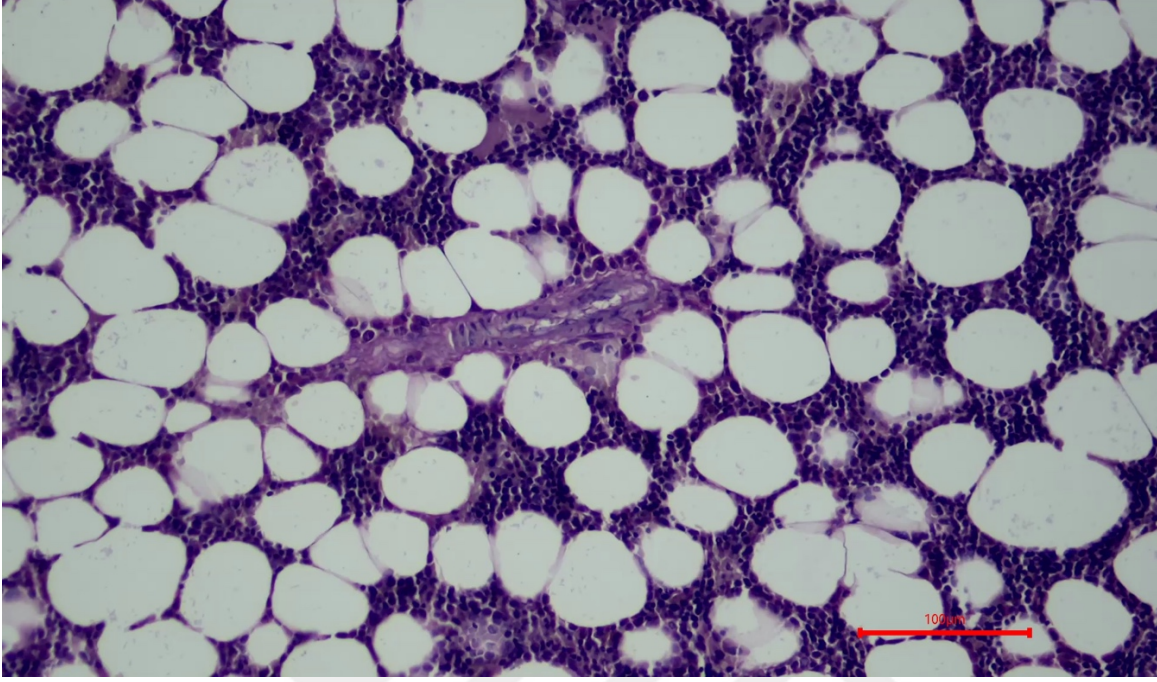


Resim 7: Tavşan kalçasının (A) koronal, (B) sagittal ve (C) aksiyel MR görüntüleri. İnce ok: Trokanter majör. Çizgili ok: Femur başı. Kalın ok: Trokanterik fossa. *: Asetabulum

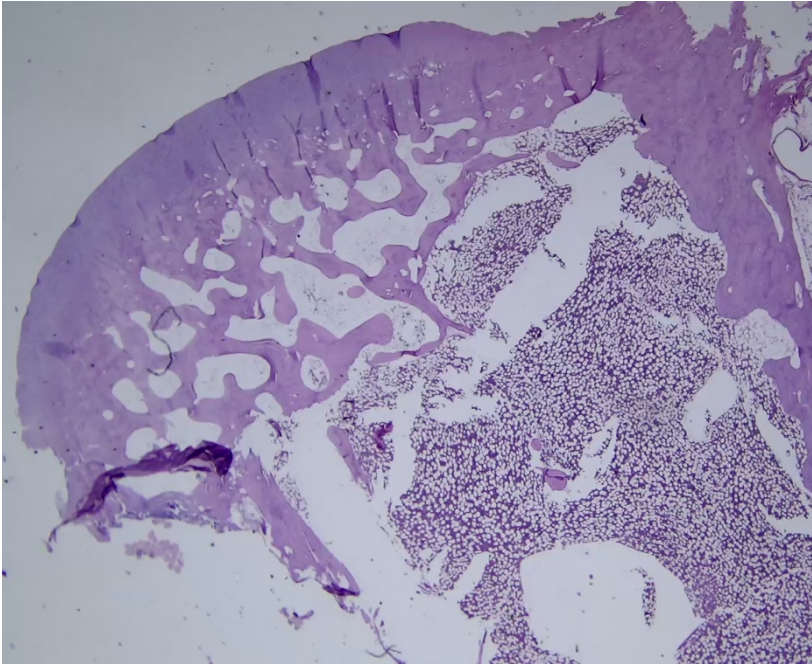
Normal tavşan kalçasına ait histolojik kesitler Resim 8-12’de gösterilmiştir.



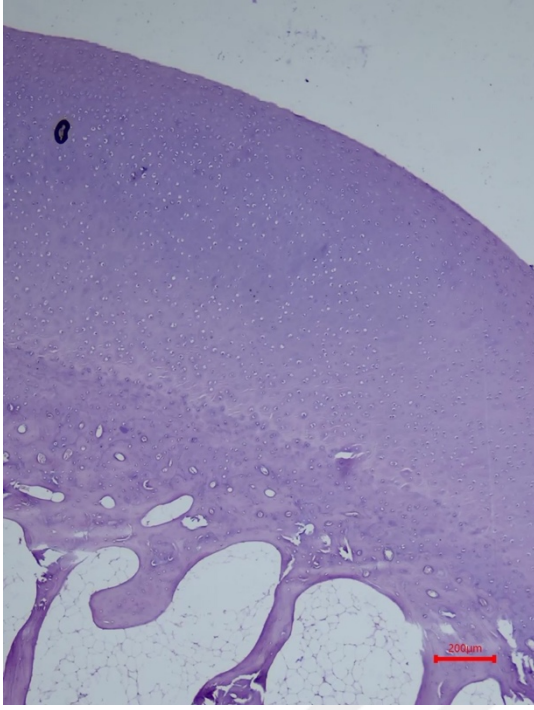
Resim 8: Normal tavşan kemik iliği (H&E, 4X büyütme)



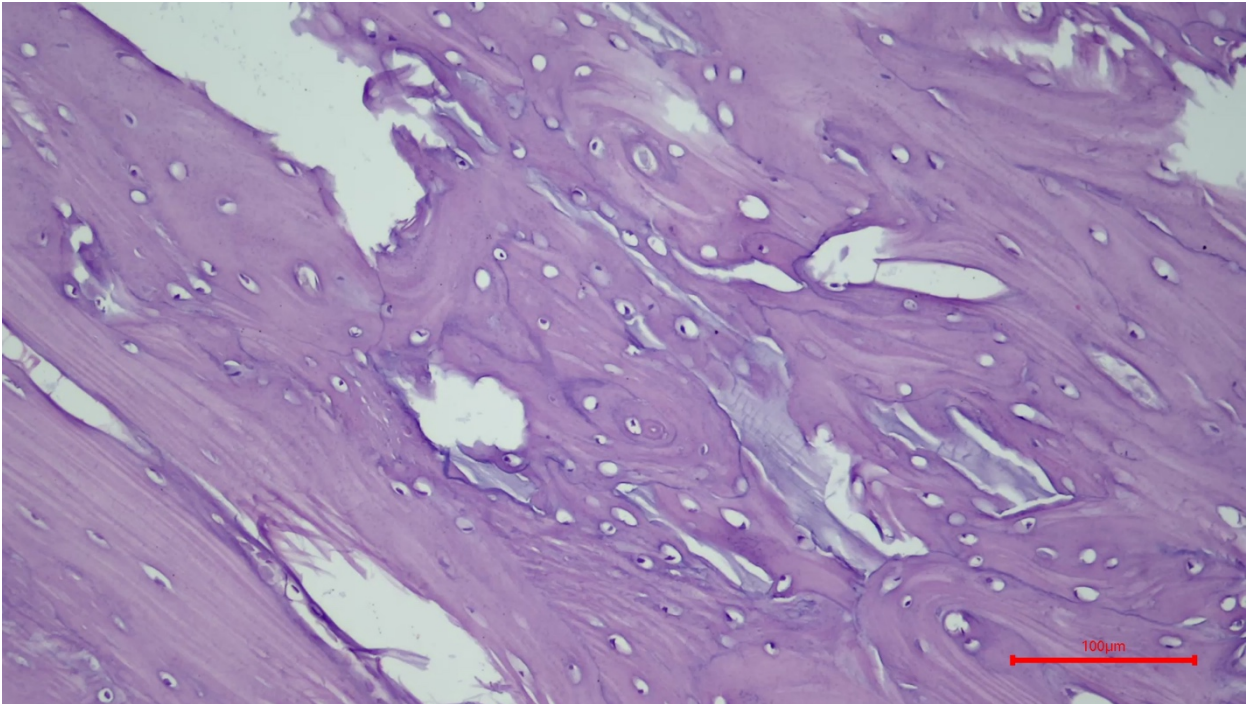
Resim 9: Normal tavşan kemik iliği (H&E, 20X büyütme)



Resim 10: Normal tavşan femur başı ve boynu. K= Kıkırdak S=Subkondral alan M= Metafiz (H&E, 1X büyütme)



Resim 11: Tavşan femur başı kıkırdığı ve subkondral alan. Açık renkli hat (T) non-mineralize kıkırdak (K) ve mineralize kıkırdak (MK) arasındaki ‘tidemark’ çizgisi. K= Kıkırdak T=Tidemark MK=Mineralize Kıkırdak S=Subkondral alan (H&E, 4X büyütme)



Resim 12: Normal trabeküler yapı. Lakünlerin içi osteosit ile dolu. (H&E, 20X Büyütme)

2.3 Femur başı osteonekrozu

Giriş

Osteonekroz (ON) tek bir hastalık olmayıp pek çok farklı sebep dolayısıyla kemik ölümü ile sonlanan bir durumu tanımlar (27). Steinberg ve ark. osteonekrozu ‘en sık olarak kan akımının bozulması sebebiyle sınırlı bir kemik dokunun hücrel hasar sonrası nekroza gitmesi’ olarak ifade etmiştir (28). Literatürde avasküler nekroz, aseptik nekroz veya subkondral avasküler nekroz olarak da geçmektedir. Osteonekrozun oluşmasında esas olarak femur başının mikrosirkülasyonunun bozulmasının etkili olduğu öne sürülmektedir (29). Geleneksel olarak avasküler nekroz (AVN) terimi kullanılsa da, iskeminin kaynağı ‘damar olmaması’ değil, kan akımının bozulması olduğu için ‘iskemik osteonekroz’ veya osteonekroz (ON) terimi daha uygundur. Bu sebeple osteonekroz terimi, güncel olarak avasküler nekroza tercih edilmektedir (30).

Tarihçe

ON ilk olarak 1738’de Alexander Munro tarafından tanımlanmıştır (31). 1794’te James Rusell kemik nekrozu üzerine detaylı bir patolojik inceleme yayınlamıştır (32). Daha sonra 1829 ile 1842 arasında Jean Cruvilhier kan akımındaki bozulmaya sekonder femur başında oluşan deformasyonu göstermiştir (33).

Freund 1936’da bilateral femur başı aseptik nekrozu olan bir vakada hastalığın ilk detaylı tanımını yapmıştır (34). Chandler 1948’de yazdığı bir makale ile hastalığın vasküler etiyolojisini ortaya koymuştur (35). 1953’te Trueta ve Harrison yetişkin insan kalçasının vasküler anatomisini ortaya koymuş olup hastalığın patogenezi hakkında önemli katkılar yapmıştır (5). 1962’de Mankin ve Brower 27 vakalık bir seri yayınlamış olup bu tarihten sonra literatürde osteonekroz ile ilgili pek çok araştırmacı bulgularını yayınlamıştır (36,37).

Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri

Osteonekroz en sık femur ve humerus başlarını etkiler ancak dizde, ayak, ayak bileği ve elin küçük kemiklerinde, vertebralarda ve yüz kemiklerinde görülebilir (38,39). 1995’te yapılan bir çalışmada ABD’de yıllık insidansının 10.000 ile 20.000 arasında olduğu bildirilmiştir (40). SİON tanısı alan hastaların %75’i 30 ile 60’lı yaşlardadır. Güncel insidans hakkında kesin verilen olmamakla birlikte yıllık 20.000’den fazla olduğu ve ABD’de yapılan tüm primer kalça artroplastilerinin %10’unun ON zemininde yapıldığı düşünülmektedir (41). Farklı popülasyonlarda

ON sıklığı farklı olup, bunun genetik faktörlerle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. AVN zemininde total kalça protezi yapılan hastaların ortalama yaşı 38 olup ameliyat esnasında hastaların sadece %20'si 50 yaşından daha büyüktür (42). Kalça eklemi ön planda tutulmakla beraber, diz, omuz ve dirsek eklemleri de etkilenebilir. ON %60 vakada bilateraldir (28).

FBON kompleks bir hastalık olup etiolojisinde hem genetik hem de çevresel faktörler rol oynayabilir. En sık sebebi travmadır. Buna karşılık, travma dışında da pek çok risk faktörü tanımlanmıştır (43). Atravmatik ON vakalarının yarısından çoğu uzun süreli kortikosteroid tedavisi ve alkol zemininde olmaktadır (44). Literatürde osteonekroz etiolojisinde steroidlerin %3 ila %38 vakada rol oynadığı bildirilmiştir (45). Diğer ilişkili risk faktörleri koagülasyon bozuklukları, hiperlipidemiler, eritrosit bozuklukları, disbarizm, HIV enfeksiyonu, sigara içiciliği ve bazı genetik faktörlerdir(44). Vakaların yaklaşık %15'inde herhangi bir predispozan risk faktörü saptanamayıp bunlar 'idiopatik' olarak adlandırılır (41). Risk faktörleri Tablo 1'de özetlenmiştir.

Osteonekrozun etiolojisinde ilk olarak travmanın rolü dikkat çekmiş olsa da, literatürde 1913'te, dalgıç ve tünel çalışanlarında osteonekrotik lezyonlardan bahsedildiğini görüyoruz(46). Bu durum literatüre daha sonra Caisson hastalığı (disbarik osteonekroz) olarak geçmiştir. İlk defa Axhausen 1928'de osteonekrozun muhtemel sebeplerinden birinin tromboembolizm olabileceğini öne sürmüştür (47). Orak hücreli anemi ve diğer hemoglobinopati hastalarında gerçekleşen kemik değişiklikleri 1930'larda detaylı olarak ortaya konulmuştur (48).

Kortikosteroidler çeşitli çocukluk ve yetişkin hastalıklarını tedavi etmede kullanılan kuvvetli anti-inflamatuar özellikler olan ilaçlardır. Amerika'da 30 milyondan fazla insanın akut veya kronik hastalıklar sebebiyle steroid tedavisi aldığı tahmin edilmektedir. Özellikle akut lenfositik lösemi (ALL), sistemik lupus eritematozus (SLE) ve renal transplant gibi belli çocukluk hastalıklarında sistemik steroid kullanımı yüz güldürücü sonuçlar vermiştir (49–51).

Buna karşılık, kortikosteroidlerin birtakım yan etkileri mevcuttur. Hiperkortizolizmin kemik üzerindeki olumsuz etkilerini ilk fark eden 1930'larda Harvey Cushing olmuştur. Kemik üzerindeki etkisi ilk olarak Cushing Hastalığı'nın bir komponenti olarak tanımlanmış, o günden bu güne kortikosteroid tedavisi ile osteoporoz, kırık ve osteonekroz arasındaki ilişki daha net olarak ortaya konmuştur (52–55). Uzun süreli steroid kullanımına bağlı FBON ilk olarak 1957'de Pietrogrande ve Mastromarino tarafından bildirilmiştir (56). Daha sonra gelen yayınlarla travmatik olmayan osteonekrozların büyük bölümünün steroid veya alkol ile ilişkili olduğu

Tablo 1: Osteonekroz için risk faktörleri (46) (adapte edildi)

1. Travmatik risk faktörleri
2. Nontravmatik risk faktörleri
 - a. Kortikosteroid kullanımı (0.5 mg/kg'dan fazla)
 - b. Alkol bağımlılığı
 - c. HIV
 - d. Radyoterapi
 - e. Sistemik Lupus Eritematozus
 - f. Orak Hücreli Anemi
 - g. Dislipidemi (hipertrigliseridemi)
 - h. Caisson Hastalığı
 - i. Gaucher Hastalığı
 - j. Yağ embolisi
 - k. Organ transplantasyonu
 - l. Endojen hiperkortizolizm
 - m. Böbrek yetmezliği
 - n. Pankreatit
 - o. Kemoterapi
 - p. Koagülasyon bozuklukları (hiperkoagülopati)
 - q. İdiopatik

gösterilmiştir (57–59). Bu tarihten itibaren literatürde pek çok çalışmada steroid ve osteonekroz ilişkisi bildirilmiştir.

Kortikosteroid kullanımının artmasıyla kas iskelet sistemindeki bu tür komplikasyonların insidansı da artmaktadır. Steroid ilişkili ON'nin daha hızlı ilerlediğini gösteren yayınlar mevcuttur. Chernetsky ve ark. steroid öyküsü olan ve olmayan ON hastalarının kor dekompresyon spesimenlerinde yaptığı çalışmada her iki gruptaki histolojik özelliklerin benzer olduğunu, ancak canlı kemik ve patolojik evre açısından farklılıklar sergilediğini saptamıştır. Bu araştırmacılar

spesimenlerin patolojik evrelerini Arlet ve Durroux tarafından tanımlanan yönteme göre sınıfladıklarında, kortikosteroid alan hastalarda evrelerin genelde daha ileri olduğunu bulmuşlardır (42).

Klinik tanı konulmuş kalça ON olgularının %80 tedavi edilmezse eklem yüzünde kollaps ve takiben artroz gelişir (41) (Resim 13). Bu nedenle FBON tedavisinde ön planda eklemin çökmesinin engellenmesi ve artroplasti gereksiniminden korunması hedeflenmelidir. Özellikle pediatrik ve genç erilişkin hasta grubunda, artroplasti ihtiya nı engelleyecek çözümlere ihtiyaç vardır. Medikal ve cerrahi tedavide kaydedilen ilerlemelere rağmen, ON'nin ideal tedavisi konusunda halen ihtilaf mevcuttur (60). Etkinliği klinik çalışmalarla kanıtlanmış bir profilaksi yöntemi günümüz şartlarında mevcut değildir.



Resim 13: Sol kalça ileri evre idiopatik avasküler nekroz tanılı hastanın kalça AP grafisi. Sol femur başında sferisitede bozulma ve denejeratif değişiklikler dikkat çekmekte.

Patogeneze

Osteonekroz, yani kemik hücrelerinin ölümü, (1) kemik iliği nekrozu ve osteosit ölümü, (2) nekroz alanının etrafında reparatif süreç ve (3) nekrotik kemiğin kollapsı ve bunu takip eden dejeneratif artrit in görüldüğü bir hastalıktır. Proksimal femurda intraosseöz hipertansiyonun

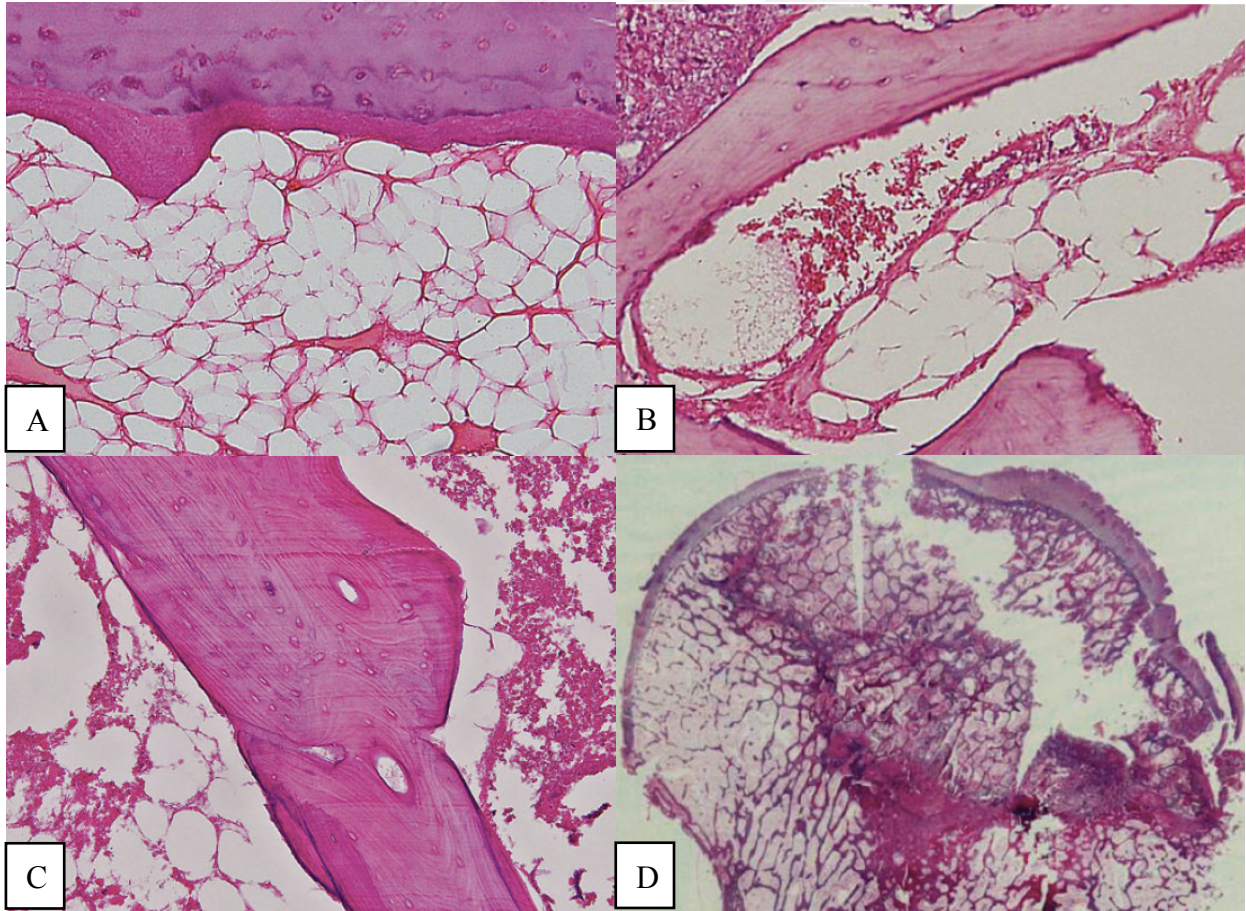
yarattığı kompartman sendromu (61), yağ embolisine bağlı intravasküler koagülasyon (62) ve yağ hücresi hipertrofisi (63) muhtemel mekanizmalar olarak öne sürülmüştür. Bunlar patolojiye katkı sağlasalar da, hiçbiri tek başına patofizyolojiyi tam olarak açıklayamamaktadır. Direkt hücre hasarı yaratan radyasyon nekrozu (64) ve kemoterapi alan hastalarda görülen sitotoksik nekroz (65) haricinde, farklı etiyolojilere bağlı olarak kan akımının bozulması en muhtemel mekanizma olarak ortaya çıkmaktadır (20,40). Vasküler hipoteze göre atravmatik osteonekrozda önce tromboz oluşmakta, bunu daha sonra kan akımının engellenmesi, artmış venöz basınç, arteriyel akımın durması, hipoksi ve hücre ölümü takip etmektedir (66,67).

Etiyolojiler farklı olsa da, hasar sonrası olaylar hücresel düzeyde benzer şekilde gerçekleşir. Hastalığın evresine bağlı olarak kemik iliği ödemi, yağ hücresi ve osteosit nekrozu, fibrozis, ‘creeping substitution’ ve osteoporoz görülebilir. Kan akımının bozulmasıyla saatler içinde hücre hasarı ve ölümü oluşur. Kemik iliğindeki hücrelerin iskemiye hassasiyeti birbirinden farklıdır. Hematopoetik hücreler en hassas olup iskemide genellikle 12 saat içinde ölürlər (68). İkinci günden itibaren kemik iliğindeki yağ hücreleri ölür ve çekirdekleri boyanmamaya başlar (69). Yağlı iliğin nekrozu Arlet ve Durroux Tip 2 lezyon olarak adlandırılır ve bu iskeminin ilk mikroskopik bulgusudur. Bu evrede henüz kemik iliği hücreleri ve osteositlerin tamamen öldüğü fokal bir lezyon görülmez. Eğer iskemi geçicisiyse bu lezyon ilerlemez ve ‘sınır nekroz’ (borderline necrosis) olarak adlandırılır (70). İskemiden sonra 2-5 gün içinde osteositler yok olmaya başlar ve 2-4 hafta içinde tamamen yok olurlar (68,69). Osteositlerin çoğu ölüp sekestrum oluştuğunda bu Arlet ve Durroux Tip 3 lezyon olarak adlandırılır. Bir sonraki aşamada sekestrumun etrafında yabancı cisim reaksiyonu oluşur. Histiosit ve dev hücreler sekestrumun etrafında fibröz bir kapsül oluşturur. Buna Arlet ve Durroux Tip 4 lezyon denir ve ON’nin kesin tanısını koydurur (Resim 14D). Arlet ve Durroux sınıflaması Tablo 2’de özetlenmiştir (71,72).

Arlet ve Durroux Tip 1 histolojinin ON tanısı koydurmayacağı akılda tutulmalıdır. MR kullanıma girdiğinden beri tanıda kor biyopsi yapılmadığı için FBON tanısı koymada günümüzde genellikle histopatolojik yöntemlere ihtiyaç duyulmamaktadır.

Tablo 2: Arlet ve Durroux osteonekroz sınıflandırması

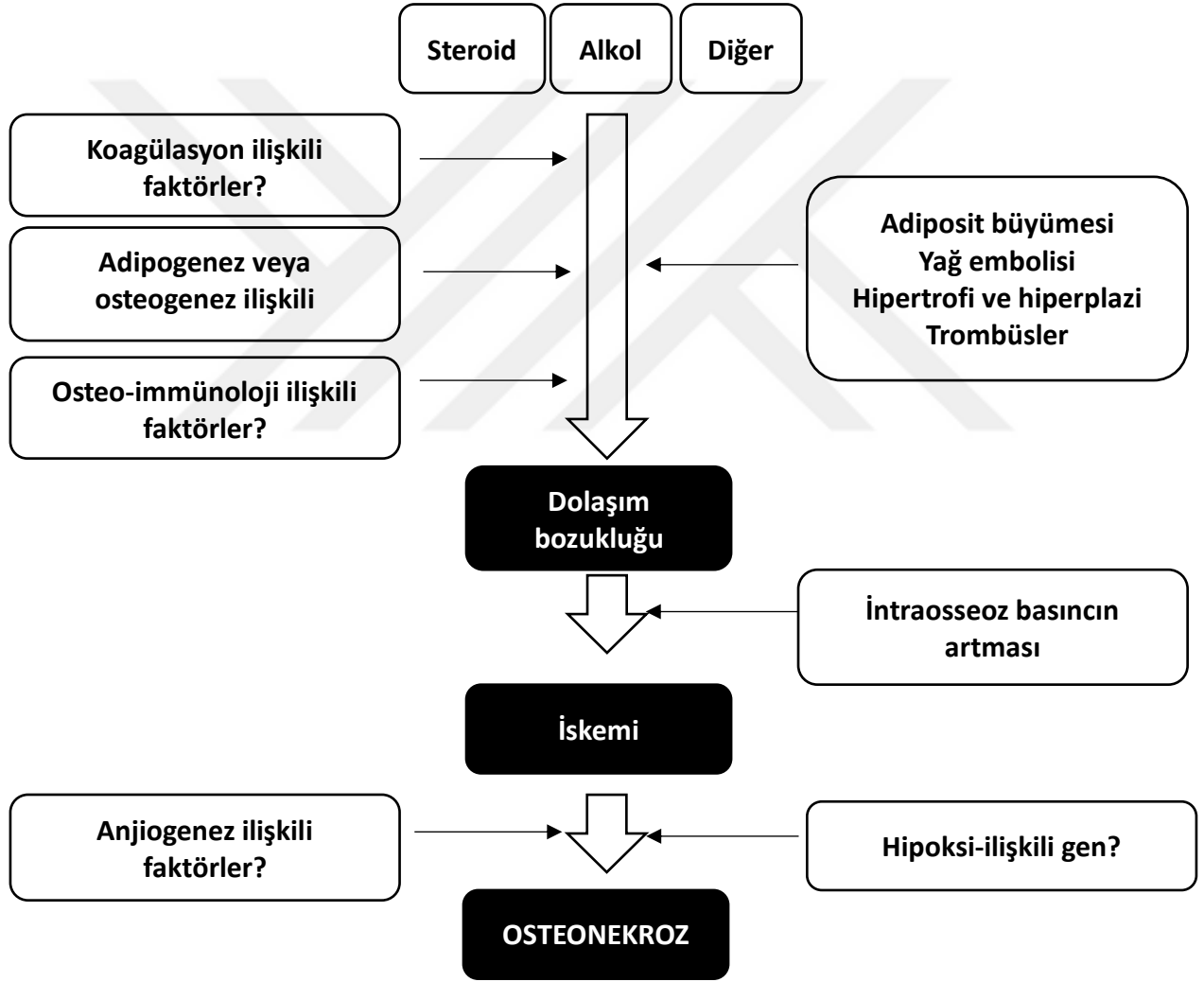
Mikroskopik Bulgular	
Tip 1	Kemik iliği kaybolur, kemik iliği boşluğu büyük yuvarlak ve ovoid yağ hücreleri ile dolar
Tip 2	Yağlı iliğin nekrozu ve hematopoetik iliğin granüler tipte nekrozu
Tip 3	Komplet medüller ve trabeküler nekroz
Tip 4	Yoğun medüller fibrozisin eşlik ettiği komplet nekroz ve ölü trabeküllerin yanında yeni kemik oluşumu



Resim 14: Farklı Arlet ve Durroux osteonekroz evrelerinin histolojileri (A) Arlet ve Durroux Tip 1 lezyon. Hematopoietik hücreler tükenmiş ve kemik iliği yağ hücreleri ile dolmuş. Lakünlerde osteositler mevcut (B) Arlet ve Durroux Tip 2 lezyon. Kemik iliğindeki yağ hücrelerinin nukleusla-

rı boyanmamış ve nekroz var. Lakünlerin yarısından fazlasında osteosit mevcut. (C) Arlet ve Durroux Tip 3 lezyon. Kemik iliğinde nekroz mevcut ve lakünlerin çoğu boş. (D) Arlet ve Durroux Tip 4 lezyon. Sekestremun periferinde yabancı cisim reaksiyonu görülüyor. Histiosit ve dev hücreler biraraya gelerek fibröz bir kapsül oluşturmuş. (H&E, 100X büyütme) (Resimler ve açıklamalar Koo ve ark.'dan alınmıştır (20))

Bu süreç sırasında yıkım süreci tamir sürecinden daha hızlı ilerlediğinde, femur başında zaman içinde kollaps gelişir ve eklem kıkırdağı çöker. Nihai olarak eklemde artroz gelişir. Kim ve ark. osteonekrozla sonuçlanan bu kaskadı şu şekilde özetlemişlerdir (73):



Şekil 6: Osteonekroza sebep olan farklı çevresel ve genetik faktörlerin muhtemel etki mekanizması

Steroid İlişkili Osteonekroz

Yüksek doz kortikosteroid kullanımı (2-3 ay içinde yaklaşık 2 g prednizon kullanımı), idiopatik osteonekroz için en sık risk faktörüdür (74–76). Ne yazık ki SİON'un patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır (77). Bunun sebeplerinden bir tanesi, steroid kullanılmasına neden olan altta yatan hastalıkların çoğu zaman ON için bağımsız birer risk faktörü olmasıdır. Bununla uyumlu olarak SİON insidansı altta yatan hastalığa göre belirgin farklılık göstermektedir (43).

Kortikosteroid tedavisinin yağ hücresi boyutu ve hacminde büyümeye sebep olduğu bilinmektedir (63). Kemik iliğindeki artmış yağ içeriğinin intraosseöz basıncı arttırıp iskemi yaratabileceği hipotezi statinlerin SİON tedavisi ve profilaksisinde araştırılmasını beraberinde getirmiştir. Ne var ki bunlar rutin klinik kullanıma girmemiştir.

SİON vakalarında çoğu hastanın uzun süre kortikosteroid tedavisi aldığı bilinmektedir. Buna karşılık, beraber kısa süreli tedavi alan hastalarda da SİON görülebilmektedir. Hatta, son derece nadir olmakla beraber, kortikosteroidlerin tek doz intraartiküler uygulaması ile dahi FBON bildirilmiştir. Al-Omari ve ark.'nın 2020 yılında yayınladıkları olgu sunumu literatürdeki beşinci vakadır (78).

Diğer taraftan, uzun süreli kortikosteroid tedavisi alan tüm hastalar içinden ancak %8-10'u ON geliştirir (74). Bu farklılığın altta yatan primer hastalığa bağlı olabileceği gibi genetik sebeplerden kaynaklanabileceği de öne sürülmüş olup çeşitli gen polimorfizmleri araştırılmıştır. Öne sürülen sorumlu polimorfizmlerden biri vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) polimorfizmidir.

VEGF, endotele spesifik bir mitojen olup embriyogenez ve iskelet büyümesi sırasında fizyolojik anjiyogenezde çok kritik bir rol oynamaktadır (79). VEGF aynı zamanda vasküler permeabilite faktörü olarak da adlandırılır. Bu geçirgenlik arttırıcı etkisi inflamasyon ve diğer patolojik durumlardaki önemli rollerinden biridir (80). VEGF'nin in vitro çalışmalarda doza bağlı olarak eNOS aracılığıyla vazodilatasyon yaptığı (81), in vivo çalışmalarda ise IV enjeksiyon ile taşikardi ve hipertansiyon yaptığı bildirilmiştir (82). VEGF, hipoksi ile indüklenen kuvvetli bir anjiogenik sitokin olup aynı zamanda kemik ve kıkırdak yapımında da rol oynamaktadır. Bir başka deyişle VEGF ekspresyonu, kemik tamiri sürecinde anjiyogenez ve osteogenezi ilişkilendiren önemli bir mekanizmadır (83). Bu sebepten kemik oluşumunda çok kritiktir (84).

Yapılan çalışmalar, VEGF'nin osteonekroz ile ilişkili olabileceğini ortaya koymuştur. Lee ve ark., VEGF polimorfizminin SİON gelişimindeki rolünü araştırdıkları klinik çalışmada az indüklenen VEGF haplotiplerinin SİON gelişen hastalarda anlamlı olarak daha fazla çıktığını bulmuşlardır (1). Osteonekrozun klinik seyrini belirleyen faktörlerden biri de tamir süreçlerinin etkinliğidir (85). FBON ve Legg-Calve-Perthes hastalarında femur başının etrafındaki nekrotik alanlarda artmış VEGF ekspresyonu gözlenmiştir (77,86–88).

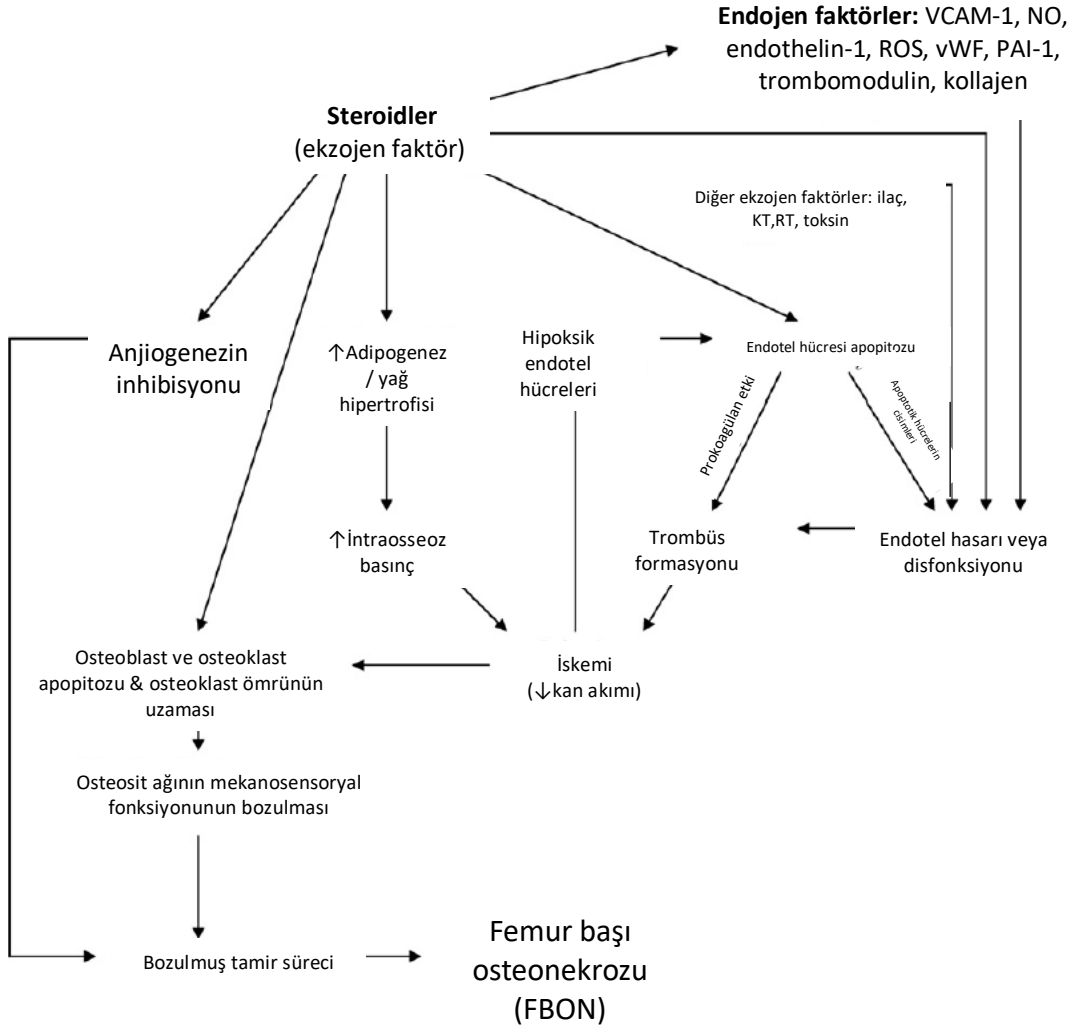
Kabata ve ark. tavşanlarda yaptıkları SİON modelinde kortikosteroid verilen tavşanlarda VEGF'nin ilk bir hafta içinde geçici olarak arttığını, 2 hafta ve sonrasında ise neredeyse normale döndüğünü bulmuştur (89). Katsube ve ark. VEGF gen transferi yapılmasının nekrotik kemiğin revaskülarizasyonu arttırdığını bildirmiştir (90). Benzer şekilde Kai ve ark., 2009 yılında Yeni Zellanda cinsi tavşanlarda yaptıkları çalışmada, VEGF geni ile transfeksiyonun lokal anjiyogenezi ve nekrotik femur başındaki tamiri arttırdığını bulmuşlardır (91).

Kortikosteroidlerin VEGF üretimini baskıladıkları bilinmektedir (92–94). Dahası hipoksi kortikosteroidlerin bu etkisini arttırmaktadır (95). Wang ve ark. Yeni Zellanda tavşanlarında lipopolisakkarid ve kortikosteroid modeli ile ON yaptıkları çalışmada steroid almış tavşanlarda VEGF ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığını ve bunun azalmış kan akımına eşlik ettiğini bildirmişlerdir (96). Ma ve ark. yaptıkları çalışma ON tedavisinde ekstrakorporeal şok dalga tedavisinin (ESWT) pozitif etkilerinin VEGF'ye bağlı olabileceğini bildirmişlerdir (97). Literatürde anti-VEGF tedavisi ile ilişkilendirilmiş osteonekroz vakaları bulunmaktadır (98).

O halde VEGF'nin aşağı regülasyonunu engellemek potansiyel olarak kortikosteroidlerin bu etkisini engelleyebilir. Wen ve ark., 2008 yılında Nature dergisinde yayınlanan çalışmasında araştırmacıların femur başı osteonekrozunda VEGF ile anjiyogenezi oluşturmayı denediğini ancak başarısız olduğunu belirtmiştir (99). Bu başarısızlığı ön planda ek işlem olarak dekompresyon yapılmamasına bağlamış, ayrıca VEGF'nin damar permeabilitesini arttırmak suretiyle intraosseöz basıncı yükseltmiş olabileceğini bildirmiştir. Buna karşılık, farklı araştırmacılar tarafından VEGF'nin potansiyel tedavi edici etkisi olabileceği iddia edilmiştir (100,101).

eNOS geni polimorfizminin de ON için bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir. NO üretiminin azalması anjiyogenezi ve kemik yapımını engelleyip trombüs oluşumunu arttırabilmektedir (2). Endotelial nitrik oksit aynı zamanda anjiyogenezi için potent bir stimülatördür (102).

Kerachian ve ark. oldukça kompleks olan bu mekanizmayı şu şekilde özetlemişlerdir (103):



Şekil 7: Steroid ilişkili osteonekrozun muhtemel patofizyolojisi. KT= Kemoterapi RT= Radyoterapi. VCAM-1=Vasküler Hücre Adhezyon Molekülü-1. ROS= Reaktif Oksijen Ürünleri. NO: Nitrik oksit. vWF= von Willebrand faktör. PAI-1: Plasminojen aktivatör inhibitörü

Klinik prezentasyon ve süreç

Femur başı osteonekrozunda ağrı genelde kasıkta olup bazı vakalarda uyluğa, dize ve posterior kalçaya yansıyabilir. Kontralateral kalçanın 2 yıl içinde %55 etkilendiği bildirilmiştir (45). Alt ekstremitayı tutan ON'lerde ağrı ve yük verememe şikayeti ön plandadır. Femur başındaki lezyon küçükse ve yük taşımayan bir bölgedeysen tam veya kısmi iyileşme görülebilir veya asemptomatik kalabilir. Daha büyük, özellikle yük alan bölgedeki lezyonların prognozu kötüdür (28). Zaman içinde eklem yüzeyinin altındaki trabeküler alan zayıflar (hilal bulgusu) ve daha sonra eklem yüzeyinde düzleşme gerçekleşir. Pek çok vakada subkondral kollaps gelişene kadar ağrı görülmeyebilir. Ağrının sebebi olarak ön planda artmış kemik iliği basıncı ve ödemi düşünülmektedir.

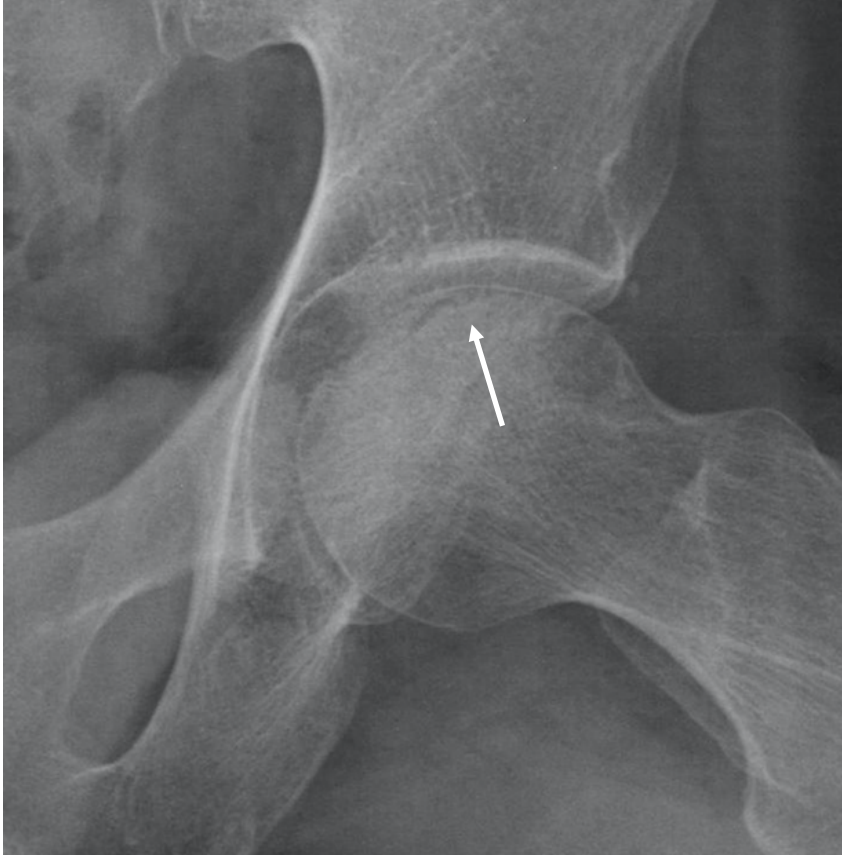
SİON'un semptomatolojisi özellikle erken dönemde sinsi ve belirsiz olabilir. Steroid kullanımının sonlandırılmasından haftalar ile bir yıl sonrasına kadar semptom görülmeyebilir. Mont ve ark asemptomatik ve tedavi edilmeyen FBON ile ilgili yaptıkları sistematik derlemede 664 kalçanın 394'ünün (%59) takip sırasında semptomatik hale geldiğini veya bu kalçalarda kollaps geliştiğini bildirmiştir (104). Medial ve küçük lezyonların progresyon oranı düşük olmakla beraber orta-büyük lezyonlarda ve lateral lezyonlarda progresyon riskinin daha fazla olduğu ve eklem koruyucu cerrahi düşünülebileceği sonucuna varmışlardır. Ayrıca orak hücreli anemi hastalarında progresyon oranının %73 ile en yüksek olduğunu, buna karşılık SLE hastalarında bu oranın %7 olduğunu bildirmişlerdir. Steroide bağlı ON'de ise bu oran %26'dır.

Özetle, semptomatik ON'nin gidişatını etkileyen birden fazla faktör bulunmaktadır. Güncel kanıtlar lezyon boyunun genelde stabil kaldığını söylemekle beraber bazı durumlarda ise kısmen küçülebileceğine işaret etmektedir. Ne var ki, nekrotik lezyonların tamamen yok olması çok enderdir (105)

Görüntüleme

Kalça ağrısının radyolojik değerlendirmesinde ilk başvuru olan görüntüleme yöntemi çoğunlukla düz grafilerdir. İleri FBON'da düz grafide görülen klasik bulgu subkondral kollapsa işaret eden 'hilal' (crescent) bulgusudur (Resim 15). Bu genelde Femur başının superolateral kısmında olur. Yapılan çalışmalar MR bulgularının ağrıdan genellikle daha önce ortaya çıktığını göstermektedir (106). Düz grafiler MR kadar sensitif olmadığı için özellikle erken evre ve henüz

subkondral kollaps gelişmemiş hastaların tanı ve takibinde MR vazgeçilmezdir. FBON tanısında MR ve sintigrafiyi karşılaştıran bir çalışmada MR'ın %100 duyarlılığına karşın sintigrafın %81 duyarlı olduğu bildirilmiştir (107). Görüntülemeye kullanılabilecek diğer yöntemler BT ve PET olmakla beraber pratikte bu yöntemlere ihtiyaç duyulmamaktadır.



Resim 15: FBON tanılı hastanın sol kalça frog leg grafisi. Beyaz ok hilal (crescent) bulgusunu göstermekte (Dr Maulik S Patel'in izniyle, Radiopaedia.org, rID: 17763)

MR ve sintigrafiyi karşılaştıran bir çalışmada MR'ın %100 duyarlılığına karşın sintigrafın %81 duyarlı olduğu bildirilmiştir (107). Görüntülemeye kullanılabilecek diğer yöntemler BT ve PET olmakla beraber pratikte bu yöntemlere ihtiyaç duyulmamaktadır.

MR'da STIR, T1 ve T2'deki sinyal değişiklikleri ON tanısı koymada yol göstericidir. Genel olarak MR'da karakteristik bazı ON bulguları şunlardır (108):

- 1) T1'de etrafı sınırlı, subkondral 'bant benzeri' hipointens lezyonlar patognomoniktir (106).

Bu lezyonlar nekrotik ve reparatif alanlar arasında yer alan geçiş bölgesini gösterir.

- 2) T2 veya sıvıya hassas diğer sekanslarda dış kenarı hipointens, iç kenarı ise hiperintens çift çizgi bulgusu görülebilir.
- 3) Sıvıya hassas sekanslarda eklem yüzeyinde çökme olup olmamasından bağımsız olarak eklem efüzyonu görülebilir. Kesin olarak sebebi bilinmese de, efüzyonun ON ilişkili sinovite bağlı olduğu düşünülmektedir (109).

Sınıflandırma

Literatürde osteonekroz için çok sayıda farklı sınıflandırma mevcuttur. Mont ve ark., yapmış olduğu sistematik derlemede, literatürdeki çalışmaların %85'inde bu sınıflamalardan üçünün kullanıldığını bildirmiştir. Bunlar Ficat ve Arlet sınıflması, UPA sistemi ve ARCO sistemidir.

Tablo 3: Farklı sınıflamaların literatürde kullanım sıklığı. Mont ve ark.'dan kısaltılarak alınmıştır (112)

	Yayınlanma yılı	Kullanan Çalışma Sayısı
Ficat ve Arlet (110)	1960lar	96
University of Pennsylvania (111)	1984	31
Association Research Circulation Osseous (ARCO) (112)	1991	18
Japanese Orthopaedic Association (113)	1987	7
Marcus et al (114)	1973	5
Sugioka (115)	1978	4
Kerboul ve ark. (116)	1974	2

Ficat ve Arlet Sınıflaması

Ficat ve Arlet sistemi 1960'larda çıkmış olup daha sonra modifiye edilmiştir (44). Literatürde en çok atıfta bulunulan 1970 versiyonudur (117). Bu versiyonda MR kullanılmamakta ve etkilenen alanın büyüklüğüne dair bir değerlendirme yapılmamaktadır. 5 evre tanımlanmıştır. Bunlardan I ve II basit nekroz, III ve IV ise kollaps ile komplike olmuş nekroz olarak ayrıca gruplanır. Bu evrelere ek olarak herhangi bir klinik ve radyolojik bulgunun olmadığı 'Evre 0' da tanımlanmıştır. Evre 1'de henüz radyografik değişiklikler oluşmamıştır ancak klinik bulgular mevcuttur. Evre 2'de femur başında değişiklikler görülmeye başlanır. Nekrotik kısmın etrafında skleroz görülebilir. Nekroz alanının içinde küçük kistler seçilebilir. Evre 2 ile Evre 3'ün ayrılmasında femur başının kısmen yuvarlaklığını kaybetmesine sebep olan subkondral kollaps gelişimi ve bunun radyolojik sonucu olan 'hilal' bulgusu kullanılır. Evre 3'te düz grafilerde sekestrem ve kollaps mevcuttur ancak eklem aralığı korunmuştur. Evre 4 bu kaskaddaki son aşamayı tarif eder ve deforme olmuş femur başına eşlik eden dejeneratif artrit bulgularını içeren evredir.

Ficat sınıflaması 1970'lerde çıktığında, henüz MR mevcut olmadığı için radyografileri normal olan hastalarda meduller dolaşımı incelemek için Kemiğin Fonksiyonel İncelenmesi (Functional Exploration of Bone – FEB) yöntemi kullanılmıştır (110). Bu yöntem kemik iliği basıncının ölçülmesi, intramedüller venografi ve son olarak kor biyopsiden oluşmaktadır. Kor biyopsi bulguları Arlet ve Durroux sınıflamasına göre tiplendirilir (72) (Bkz: Patogenez).

University of Pennsylvania Sınıflaması

Bir diğer sıkça atıfta bulunulan sınıflama University of Pennsylvania sınıflamasıdır. Steinberg ve ark. hem evreyi hem de tutulum boyutunu içeren kapsamlı bir sistem geliştirmişlerdir (118). Bu sistemde 7 evre mevcuttur. Nekrotik lezyonun boyu ve eklem yüzüyle ilişkisi değerlendirilir. Evre 0'da radyografi ve MR normaldir. Evre 1'de radyografiler normaldir ancak MR'da değişiklikler başlamıştır. Evre 2'de radyografilerde ON ile uyumlu değişiklikler görülmeye başlamıştır. Evre 3 subkondral alanın hemen altında yer alan radyolusen 'hilal' şeklinde lezyonla karakterizedir. 'Hilal' bulgusu intakt bir eklem yüzünün altındaki trabeküler kemiğin çökmesini gösterir. Femur başında henüz düzleşme yoktur. Evre 4'te femur başında kollaps mevcuttur. Evre 5'te eklem aralığı daralması ve asetabulumda değişiklikler başlamıştır. Evre 6 ileri evre koksartroza

işaret eder. Bu sınıflamanın en önemli özellikleri hem manyetik rezonans görüntüleme bulgularını hem de lezyon büyüklüğünü dahil eden ilk sınıflama olmasıdır (119).

ARCO Sınıflaması

ARCO sınıflaması 1991 ile 1993 arasında, tek ve kapsamlı bir sınıflandırma ihtiyacından ortaya çıkmıştır (112,120). 3. versiyonunda evreler 5'e indirilmiş olup lezyon boyu UPA sistemine göre tanımlanmış, ek olarak Japon sistemine göre medial santral ve lateral olarak da etiketlenmiştir. ARCO sınıflamasında lezyon boyutu küçük, orta veya büyük olarak ayrılır. Boyut ölçmede düz grafilere veya MR'da açısal ölçümlerden faydalanılabilir.

ARCO sınıflaması ilk olarak 6 evre içermekle beraber 1994'te modifiye edilip günümüzde kullanılan formuna ulaşmıştır (120). Bu versiyonda ARCO evre 0'da histolojik inceleme hariç tüm tanısal tetkikler normaldir. ARCO evre 1'de radyografi bulgusu yoktur ancak MR bulguları ortaya çıkmıştır. ARCO evre 2'de radyografilerde lokal osteopeni, kemik iliği nekrozu ve kemik infarktları mevcuttur. Buna sinovyal efüzyon da eşlik edebilir (106). Subkondral çökme yoktur. ARCO evre 3'te subkondral kollaps gerçekleşmiştir. ARCO evre 4'te eklem yüzeyi uyumsuzluğu zemininde ileri dejenerasyon gelişir.

Bu sınıflandırmalara ek olarak etkilenen alanın tam olarak ölçülmesi için bazı yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan en çok kullanılanı 1974'te Kerboul ve ark. tarafından geliştirilen yöntemdir (116). Bu yöntemde etkilenen yüzeyin açısal miktarı AP ve lateral grafilere ölçülür ve toplanır. MR'ın ON'nin boyutunu hesaplamada daha başarılı olduğunu bildiren yayınlar mevcuttur. 1995'ten itibaren Kerboul metodu midkoronal ve midsagittal MR kesitleri ile hesaplanacak şekilde modifiye edilmiştir (121).

İdeal bir sınıflandırma sistemi güvenilir ve tekrarlanabilir olmalıdır. Günümüzde tüm yazarların üzerinde anlaştığı kapsamlı ve evrensel olarak kabul görmüş bir sınıflandırma bulunmamaktadır (122). Ficat ve Arlet sistemi ilk ve en çok kullanılan yöntem olmaya devam etmektedir. Yeni çıkan sınıflandırmalar farklı avantajlar vadetse de, büyük çalışmalarla geçerlilikleri kanıtlanmalıdır. Bugün için FBON tanısında kullanılacak sınıflandırma sistemi araştırmacıya ve klinisyene bağlıdır (123). Mont ve ark. bu sınıflamalarda kullanılan kriterleri şu 9 madde ile özetlemişlerdir (124):

- 1) Tanı için biyopsi gerekli değildir
- 2) MRI en spesifik ve sensitif tanı metodudur
- 3) Semptomatoloji, hastalık şiddetini belirlemede güvenilir değildir ve sınıflandırma sistemlerinin parçası olmamalıdır
- 4) Prognozun en önemli belirleyenlerinden biri femur başında kollaps olup olmadığıdır
- 5) Lezyon boyutu önemlidir ancak lezyon boyutunu en iyi ölçme yöntemi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır
- 6) Asetabüler kırıkdağın etkilenmesi hastalığın evresini belirlemede önemlidir ancak bunun ameliyat öncesinde veya ameliyat sırasında değerlendirilmesi konusu henüz net değildir
- 7) Femur başının çökme miktarı hastalığın progresyonunda majör bir prognostik indikatördür
- 8) Çökmüş femur başının miktarını ve ‘hilal’in uzunluğunu ölçmek tekrarlanabilir olmayabilir
- 9) Büyük lezyonlar söz konusu olduğunda lezyonun lokasyonu çok önemli olmayabilir. Lateral lezyonlar genelde büyük olur. Medial lezyonlar, oldukça nadir olmalarına karşın genellikle küçüktür ve en iyi prognoza sahiptirler

Tedavi seçenekleri

FBON tanısı konulduktan sonra hastanın yaşı, şikayetleri, lezyonun yeri ve fonksiyonel beklentisine bağlı olarak farklı tedavi yöntemleri izlenebilir. Asemptomatik hastalarda yaklaşım tartışmalı olup, bazı yazarlar ‘bekle ve gör’ stratejisini önermektedir (105). Ancak asemptomatik ON’nin semptomatik olma riskinin yüksekliği düşünüldüğünde bu yaklaşım ideal olmayabilir (104). Bu tedaviler kabaca konservatif ve girişimsel tedaviler olarak gruplanabilir. Medikal ve cerrahi tedavide son 50 yılda kaydedilen ilerlemelere rağmen, ON’nin ideal tedavisi konusunda halen ihtilaf mevcuttur (60).

Konservatif Tedaviler

FBON tedavisinde farklı konservatif tedavi protokolleri mevcuttur. En çok kullanılan yöntemlerden bir tanesi tek başına veya başka tedavilere ek olarak yükten kurtarmadır. 819 asemptomatik AVN hastasının incelendiği bir çalışmada (125), ortalama 2.8 yıllık takip süresinde hastaların %78’inin cerrahi geçirdiği bildirilmiştir. Tam yük, parsiyel yük ve yükten kurtarma arasında bir fark bulunamamıştır. Yükten kurtarmanın hastalığın ilerlemesini engellemekte tek başına yetersiz olabileceğini öne sürülmüştür.

Özellikle koagülopati zemininde ON olan hastalarda antikoagülan kullanımı hakkında çeşitli yayınlar mevcuttur. Glueck ve ark., yaptıkları klinik çalışmada enoksaparin tedavisinin trombofili-hipofibrinoliz mevcut olan hastalarda sıklıkla primer ON'nin progresyonunu engelleyebileceğini bildirmişlerdir (126). Deneysel çalışmalarda klopidoğrel ve varfarinin de aynı amaçla kullanılabileceği öne sürülmüştür (127,128).

Kemik dokunun yağ hücreleri ile infiltrasyonu ON'nin karakteristik bir özelliğidir (129). Kortikosteroid tedavisinin hiperlipidemiye yol açarak yağ hücresi boyutu ve hacminde büyümeye neden olduğu bilinmektedir (63). Kemik iliğindeki artmış yağ içeriğinin intraosseöz basıncı artırıp iskemi yaratabileceği hipotezi statinlerin ON tedavisi ve profilaksisinde araştırılmasını beraberinde getirmiştir. Statinlerin hem hayvan çalışmalarında, hem de klinik çalışmalarda steroid zemininde gelişen ON insidansını azalttığı bildirilmiştir (130,131).

Osteoklastik aktiviteyi azaltmaları sebebiyle bifosfonatlar, osteoporoz hastalarında kemik mineral yoğunluğunun artırılması için sıklıkla kullanılmaktadır. ON'de subkondral kollapsa sebep olan, nekrozun kendisinden ziyade tamir sürecinin bir parçası olarak kemik yıkımının yarattığı mekanik zayıflık olduğu için, teorik olarak bifosfonat tedavisinin subkondral kollapsı önleyebileceği öne sürülmüştür. Bazı kanıtlar erken evrede (prekollaps) bifosfonat kullanımının faydalı olabileceğini göstermekle beraber, sonuçlar çelişkili olup tedavi dozu ve süresi hakkında net kılavuzlar yoktur (132–134).

Hiperbarik oksijen tedavisi, vazokonstriksiyon yaparak hücrel ödemi azaltmakta, ek olarak intrasellüler oksijeni artırarak hücre düzeyinde iskemi ve intrasellüler basıncı azaltmakta, ayrıca anjiogenezi ve mikrosirkülasyonu arttırmaktadır (135).

ON tedavisinde elektrik stimülasyon ve ultrason kullanımı da tek başına ve başka tedavilere ek olarak incelenmiştir (136). Massari ve ark.'nın Journal of Bone and Joint Surgery'de 2006 yılında yayınladığı bir çalışmada FBON tanılı 66 hastanın toplam 76 kalçasına pulse elektromanyetik alan stimülasyonu uygulanmış, kalça ekleminin korunmasında veya ameliyata kadar olan süreyi uzatmada etkili olabileceği sonucuna varılmıştır (Kanıt düzeyi: IV) (137). Ancak sınırlı sayıdaki kanıt düzeyi yüksek çalışmada faydaları kanıtlanamadığından, bunlar günlük pratiğe girmemiştir (138).

Girişimsel Tedaviler

Son yıllarda osteonekroz tedavisinde mezenkimal kök hücre (MKH) kullanımı gittikçe artarak araştırılmaktadır. MKH'ler kemik iliğinden veya adipoz dokudan elde edilebilir. MKH'lerin, uygulama alanında proliferasyon ve farklılaşma özelliklerinin yanı sıra ON açısından faydalı olabilecek anjiogenik sitokinler de salgıladığı bildirilmiştir (139). Bazı araştırmacılar erken evre ON tedavisinde başarı sağladıklarını bildirmişlerdir (140,141). Ne var ki, bu konudaki literatür henüz kısıtlıdır. Diğer tekniklere göre daha az invaziv olması bu yöntemi cazip kılmaktadır.

ON'nin cerrahi tedavisinin ana prensibi subkondral çökmeyi engellemektir. Küçük boyutlu prekollaplarda sıkça kullanılan tekniklerden biri kor dekompresyondur (142). Bu prosedürün osteonekrozun patogenezinde etkili mekanizmalardan biri olduğu düşünülen artmış intraosseöz basıncı azaltarak işe yaradığı düşünülmektedir. Intraosseöz basıncın azaltılmasının normal kan akımını restore ederek femur başında osteonekrozu engelleyeceği düşünülmektedir (143). Uygun hasta seçimi ve cerrahi tekniklerle uygulandığında kor dekompresyon güvenli ve etkili bir yöntemdir (125,144). Kor dekompresyon tek bir kalın oyucuyla veya çok sayıda K-teli ile, kendi başına veya ek greftleme prosedürleriyle beraber kullanılabilir.

Rotasyonel osteotomi bir başka kalça koruyucu cerrahi olarak karşımıza çıkmaktadır. Sugioka tarafından 1972'de tanımlanan bu tekniğin mantığı, rotasyonel osteotomi ile nekrotik alanı yük alan bölgeden almayan bölgeye taşımaktır. Ne var ki başlangıçta bildirilen başarılı sonuçlar batı ülkelerinde yapılan çalışmalarda tekrarlanamamıştır (145).

Yüzey artroplastisi, özellikle genç hastalarda kullanılan bir seçenektir. Uygun teknikle ve endikasyonla uygulandığında başarılı sonuçlar bildirilmiştir (146) Total kalça artroplastisi ise ileri evre FBON ile başvuran ve orta yaşlı-yaşlı hasta grubunda mükemmel bir tedavi seçeneğidir. Özellikle son yıllarda görülen triboloji alanındaki gelişmeler ve operatif tekniklerin gelişmesi komplikasyon oranını düşürüp ameliyatın orta ve uzun dönem başarısını belirgin olarak arttırmıştır (147).

Mont ve ark. 2020 yılında JBJS'de yayınladıkları 'Femur başının atravmatik osteonekrozu: Bugün neredeyiz? – 5 Yıllık Güncelleme' isimli yazıda mevcut tedavi seçeneklerini kanıt düzeyine göre derecelendirerek şu tablo ile özetlemişlerdir (122) (Tablo 4). Bu tablonun en dikkat çekici tarafı konservatif tedavi yöntemlerindeki kanıt yetersizliğidir.

Tablo 4: Literatürde farklı tedavilerin kanıt düzeyi. Mont ve ark.'dan alınmıştır[125]

Tedavi	Tavsiye Derecesi*
Operatif	
Prekollaps	
Kor dekompresyon	A
Çoklu küçük çaplı drillleme	A
Kor dekompresyona ek olarak greftleme	A
Hücre bazlı tedaviler	B
Damarsız kemik grefti ile greftleme	B
Damarlı kemik grefti ile greftleme	B
Tantalum çubuk	C
Rotasyonel osteotomi	B
Açısal osteotomi	C
Post-kollaps	
Total Kalça Artroplastisi	A
Konservatif	
Gözlem	I
Yükten kurtarma	I
Bifosfonatlar	I
Antikoagülanlar	I
Vazodilatörler	I
Asetilsalisilik asit	I
Ekstrakorporeal şok dalga terapisi	I
Pulse elektromanyetik alan	I
Hiperbarik oksijen	I

* Tavsiye dereceleri Wright ve ark. tarafından tanımlanmış olup (148), A: Girişimi destekleyen veya girişime karşı iyi kanıt düzeyini, B: Girişimi destekleyen veya girişime karşı makul kanıt düzeyini, C: Girişimi destekleyen veya girişime karşı zayıf kanıt düzeyini belirtir. I ise girişimi desteklemek veya girişime karşı çıkmak için yetersiz veya çelişkili kanıt olduğunu belirtir.

Özetlemek gerekirse konservatif tedaviler yeterli kalmadığında veya ileri evre FBON ile başvuran hastalarda girişimsel tedaviler gerekebilir. Bu tedaviler kalça eklemi koruyan veya korumayan tedaviler olarak gruplanabilir. Kalça eklemi koruyan başlıca girişimler kök hücre

tedavisi, kor dekompresyon ve bazı osteotomiler olup, korumayan girişimler başlıca yüzey artroplastisi, total kalça artroplastisidir.

2.4 Femur başı osteonekrozunda hayvan modelleri

Femur başı osteonekrozunun oluşturulduğu bir hayvan modeli patogenezi, tanı ve tedavi çalışmaları için çok faydalı olma potansiyeli taşımaktadır. Bu amaçla çeşitli hayvan modelleri önerilmiştir. Ne var ki literatüre bakıldığında sadece kortikosteroid ile subkondral kollaps, creeping substitution ve dejeneratif eklem hastalığı olan ilerleyici ON hastalığının güvenilir ve tekrarlanabilir olarak yaratılamamış olduğunu görüyoruz. Hayvan modellerinde en çok fare, rat, tavşan, domuz ve tavukların kullanıldığı görülmektedir. Bunlar dışında koyun, midilli ve bir devekuşu cinsi olan emu ile yapılan çalışmalar da mevcuttur. Yük vermedeki farklılıklar (quadruped-biped), yaş, tedavi süresi, komorbiditeler ve metabolik yollarındaki farklılıklar sebebiyle hayvanlarda yapılan çalışmaların sonuçlarının insanlara ekstrapole edilip edilemeyeceği tartışmalıdır. Biped olmaları sebebiyle tavuk ve emu modellerinin insandakine benzer FBON modelleri için daha uygun olduğunu savunan yazarlar mevcuttur (149).

Literatürdeki hayvan modellerinde osteonekrozun da farklı şekilde tanımlandığı görülmektedir. Örneğin, Bauer ve ark., boş lakünlerin varlığı ve nükleer piknozis kriter olarak kullanılmasını eleştirmektedir. Araştırmacılar, dekalsifiye edilmiş ve işlem görmüş dokularda piknozise sıkça rastlanılabildiğini belirtmiştir. Dahası iskemik olaylardan sonra osteosit nükleuslarının korunabileceğini de bildirmişlerdir (150). Öte yandan, diğer yapılan çalışmalarda osteositlerin kaybolmasının iskeminin başlangıcından sonra 2 ila 4 hafta sürebileceği de gösterilmiştir (68).

Tavşanlarda kullanılan başlıca osteonekroz modelleri travmatik ve atravmatik olarak ikiye ayrılabilir. Travmatik osteonekroz modellerinde genellikle ligamentum teresi kesme ve femur boynunu bağlama yöntemi kullanılmaktadır (151). Bu travma kriyojenik veya termal olarak da oluşturulabilir. Örneğin 2008 yılında Li ve ark. ‘mikrodalgada ısıtma’ yöntemi ile yeni bir osteonekroz modeli bildirmişlerdir (152). Buna karşılık atravmatik ON modelleri başlıca steroide bağlı ON, LPS zemininde ON ve immün reaksiyona bağlı ON’dır.

Steroid ilişkili osteonekroz (SİON) modelleri

Steroid ilişkili osteonekrozun mekanizması tam olarak bilinmese de yüksek doz steroidlerin yaptığı bazı değişiklikler literatürde sıkça bildirilmiştir. Farklı araştırmacılar steroid tedavisi sonrası serum kolesterol, trigliserid ve fosfolipidlerinin arttığı hiperlipidemik bir durum tarif etmişlerdir. Bu duruma femur başındaki osteositlerde yağ akümülasyonu da eşlik edebilmektedir (153,154). Steroidlerin kan akımına etkisi ile ilgili farklı sonuçlar bildirilmiştir. Bazı yazarlar steroid tedavisi alan hayvanlarda femur başı kan akımında veya intraosseöz basınçta hiç değişiklik olmadığını belirtirken (155,156), Wang ve ark. ise tavşan modellerinde steroidin femur başı kan akımını anlamlı derecede azalttığını, buna karşılık intraosseöz basıncı arttırdığını bulmuşlardır (157–159).

Steroidlerin kan akımını tam olarak hangi mekanizma ile etkiledikleri bilinmemektedir. Drescher ve ark. domuz modeli üzerinde yaptıkları çalışmada uzun süreli kortikosteroidin endotelin-1 üzerinden femur başı kan akımını anlamlı olarak azalttığını bildirmişlerdir (160). Bazı araştırmacılar spesifik kortikosteroid reseptörlerinin etkili olabileceğini öne sürmüştür (161). Tavşanda karotis ve aortik halkada steroidlerin potent bir vazodilatör prostasiklin üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir (162). Ratlarda steroidlerin eNOS ekspresyonunu baskıladığını bildirilmiştir (163). Genel olarak kabul edilen mekanizma kortikosteroidlerin, lokal kan akımı üzerindeki etkilerini, damarların diğer endojen maddelere hassasiyetini ayarlayarak gösterdiği (164).

Sadece steroid kullanılarak oluşturulan hayvan modellerinde ileri evre FBON genellikle oluşturulamamıştır (149). Ancak bu çalışmalarda SİON için yağ hücresi sayısının artması (63), osteositlerin yağlı dejenerasyonu (154), femur başında subkondral yağ embolisi (165) ve subkondral kemikte fokal osteolitik hücre ölümü (153,166,167) gözlemlenmiştir. Yamamoto ve ark yüksek doz kortikosteroid ile multifokal ON oluşturduklarını bildirmişlerdir (168). Sadece steroid modeli ile yapılan çalışmalar Tablo 5’de özetlenmiştir. Yamamoto ve ark 1997’de yaptıkları tavşan modelinde, o zamana kadarki literatürde sadece kortikosteroid ile hayvanlarda histolojik olarak definitif şekilde ON oluşturulamadığını bildirmiştir (168). Ancak bunun nedenlerinden birinin çalışmaların epifize odaklanması ve metafizer ve diyafizer bölgelere dikkatli bakılmaması olabileceğini öngörerek metafiz ve diyafizin de değerlendirildiği bir çalışma yayınlamışlardır. Bu çalışmada sadece tek sefer 20 mg/kg metilprenizolon enjeksiyonu ile %43 oranında multifokal ON yapmayı başarmışlardır.

Tablo 5: Sadece kortikosteroid ile oluşturulmuş tavşan FBON modelleri *

	Yıl	Preparat**	Doz	Süre	Sonuçlar
Fisher ve ark.(166)	1972	MP	1.5-3 mg/kg/gün	160 güne kadar	Yaygın osteoporoz, subkondral kemikte emboli
Jaffe ve ark.(165)	1972	K	12.5 mg/g	9 haftaya kadar	Subkondral yağ embolisi, osteonekroz yok
Cruess ve ark. (153)	1975	K	5 mg/kg	60 güne kadar	Subkondral yağ embolisi
Wang ve ark(63)	1977	MP	2.7-12.25 mg/kg/h	8-12 hafta	Yağ hücresi boyutunda artma
Gold ve ark.(169)	1978	MP	0.8 mg/g	8 gün	Osteoporoz, kemik nekrozu, yağ embolisi
Warner ve ark. (155)	1987	MP	12.3 mg/h	5-9 hafta	Osteoporoz, Osteonekroz yok
Yamamoto ve ark. (168)	1997	MP	20 mg/kg	10 hafta	ON (%43)
Miyaniishi ve ark. (170)	2002	MP	20 mg/kg	2 hafta	ON, yağ hücrelerinde büyüme
Motomura ve ark. (127)	2004	MP	20 mg/kg	2 hafta	ON (%70)
Ichiseki ve ark. (171)	2004	MP	4 mg/kg	2 haftaya kadar	ON (%70)

*Jones ve Allen'dan uyarlanmıştır(172)

**MP= Metilprednizolon, K= Kortizon

Bazı yazarlar ON'nin patogenezi multifaktoriyel olduğu için hayvan modellerinin de bunu yansıtması gerektiğini öne sürmüşlerdir (149). Bir başka bakış açısıyla insanlar altta yatan bir patolojiye karşı kortikosteroid tedavisi aldıkları için hayvanlarda da bu patolojilerin taklit edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla oluşturulan iki model bulunmaktadır.

a. Endotoksik (Schwartzman Reaksiyonu)

ON'nin patogenezinde intravasküler koagülasyonun önemli bir rolü olduğu bazı araştırmacılar tarafından öne sürülmüştür (173,174). Shwartzman reaksiyonu endotoksin (lipopolisakkarit – LPS) kaynaklı doku hasarının sistemik veya lokalize olarak yaratıldığı bir modeldir. LPS'nin lokal ve sistemik inflamasyon, endotoksik şok, hiperlipidemi, yağ embolisi gibi etkileri bilinmektedir (175–177).

Sistemik kullanıldığında, LPS enjeksiyonu sonrası endotel hücrelerinin yüzeyinde yaygın intravasküler trombüs oluşumu gerçekleşmektedir (178). Irida ve ark. sadece tek doz LPS uygulaması ile %77 oranında ON oluşturabildikleri bir model yayınlamışlardır (179). Kortikosteroidlerin, LPS'nin etkisini arttırdığı da öne sürülmüştür. Yamamoto ve ark. 1995 yılında yayınladıkları makalede kortikosteroidlerin Schwartzman reaksiyonunu güçlendirdiğini ve buna bağlı olarak ON şiddetini arttırdığını bildirmiştir (180). Bu çalışmada kontrol grubu hariç 3 grup mevcuttur. A grubu sadece LPS, B grubu LPS ve kortikosteroid, C grubu ise sadece kortikosteroid almıştır. Çalışma sonucunda hem ON insidansı hem de nekrotik alanların genişliği en fazla B grubunda bulunmuştur. Guan ve ark. da LPS ve kortikosteroid alan tavşanlarda sadece kortikosteroid alan tavşanlara göre daha fazla osteonekroz bildirmiştir (181). Kortikosteroid ve LPS ile oluşturulmuş tavşan modelleri Tablo 6'da özetlenmiştir.

b. Hipersensitivite modeli (Serum hastalığı modeli)

At serumu, hayvanlarda hipersensitivite reaksiyonu oluşturmak için araştırmacılar tarafından sıkça kullanılmıştır (182–184). Matsui ve ark. kortikosteroidlerin tek başına at serumunun yaptığı etkiyi arttırdığını bulmuştur. Sadece at serumu verilen modelde %33 olan ON oranı kortikosteroid ile at serumu verilen modelde %70'e çıkmıştır (182,184). Bu hayvanlarda histopatolojik incelemede vasküler dejeneratif lezyonlar çok dikkat çekicidir. ON'nin risk faktörlerinden birinin vaskülit olması nedeniyle, hayvanlarda bunun taklit edilmesinin mantıklı olacağı sonucuna varılmıştır (185).

Tablo 6: LPS veya LPS-KS kombinasyonu ile oluşturulmuş tavşan FBON modelleri *

	Yıl	Preparat*	Doz	Süre	Sonuçlar
Yamamoto ve ark. (180)	1995	MP+/-LPS	3*20 mg/kg MP 2*100 µg/kg LPS	4 hafta	%86 ON
Irisa ve ark. (179)	2001	LPS	1*10 µg/kg LPS	4 hafta	%77 ON, multipl trombüsler
Qin ve ark. (186)	2006	MP+LPS	3*20 mg/kg MP 1*10 µg/kg LPS	6 hafta	Tüm tavşanlarda intravasküler trombüs, %93 ON
Sheng ve ark. (187)	2007	MP+LPS	3*20 mg/kg MP 1*10 µg/kg LPS	2 hafta	%60 ON, yağ hücre boyutu ve yoğunluğunda artma
Wu ve ark. (188)	2008	MP+LPS	3*20 mg/kg MP 2*10 µg/kg LPS	6 hafta	%90 ON
Song ve ark (189)	2017	MP+LPS	3*20 mg/kg MP 1*10 µg/kg LPS	6 hafta	%83 ON

*LPS: Lipopolisakkarit, MP: Metilprednizolon, K: Kortizon

2.5 NO-cGMP sistemi ve fosfodiesteraz inhibitörleri

Kan damarlarının gevşeme mekanizmasında endotel kaynaklı nitrik oksit (NO) etkili olduğunun 1986'da Furchgott ve Ignarro tarafından bağımsız olarak bulunması araştırmacılara Nobel ödülü getirmesinin yanında tıp dünyası için de pek çok açıdan devrim niteliğinde olmuştur (190). NO, guanilil siklazı (GS) aktive ederek siklik guanozin monofosfat (cGMP) sentezini arttırmakta, ve bu sayede damarların etrafındaki düz kasları gevşetmektedir. Bunun dışında kardiyak dokuyu koruma, nöronal plastisite, endotelial geçirgenliğin ayarlanması ve gen transkripsiyonu fonksiyonları da vardır. cGMP'nin fosfodiesteraz yoluyla yıkılması bu etkiyi

sonlandırmaktadır. Farklı dokularda bu enzimin farklı spesifik alt tipleri bulunmaktadır. Fosfodiesteraz inhibitörleri selektif ve non-selektif olarak iki grupta incelenebilirler. Teofilin, non-selektif bir PDE inhibitörü olup yaklaşık 80 yıldır kullanımdadır (190).

Selektif PDE-5 inhibitörleri ise yakın zamanda geliştirilmişlerdir. İlk olarak anjina pektoris tedavisi için geliştirilen bu ajanlar, faz I klinik çalışma sırasında yan etki olarak penil ereksiyon görülmesi üzerine erektil disfonksiyon tedavisinde kullanılabilecekleri öngörülmüştür (191). Sildenafil 1998 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından erektil disfonksiyon tedavisi için onaylanan ilk PDE-5 inhibitörü olarak piyasaya sürülmüştür. Günümüzde oral PDE5 inhibitörleri klinik uygulamada en çok erektil disfonksiyon tedavisinde kullanılmaktadır. Bunun dışında pulmoner hipertansiyon ve benign prostat hiperplazisinde kullanılmaktadır. Ayrıca endikasyon dışı (off-label) olarak Raynaud fenomeni ve alopecia areata gibi farklı kullanım alanları da vardır (192).

Erektil disfonksiyon tedavisinde cGMP'nin vazodilatasyon etkisini devam ettirmesinden faydalanılır. Normal şartlar altında NO corpus cavernosumdaki kan damarlarını cGMP birikimi sayesinde genişletir. PDE-5 enzimi cGMP'yi yıkar. PDE5 inhibitörleri bu yıkımı engeller. Böylece NO'nun vazodilatör etkisinin sona ermesini engeller. En yaygın olarak sildenafil, vardenafil ve tadalafil kullanılmaktadır. Bu üç ilacın etkinliği ve yan etki profilleri benzerdir. Sildenafil ve vardenafil moleküler olarak benzer olup, tadalafilin yapısı farklıdır ve bu nedenle farmakokinetik özellikleri diğer ikisinden farklıdır.

Tadalafil seçmemizin nedenlerinden biri tadalafilin sildenafil kadar potent ve selektif olmasının yanında yarılanma süresinin çok daha uzun olmasıdır. Bu süre sildenafil için 3.7 saat olup tadalafil için 17.5 saattir (193). Bu ilaçların farmakokinetikleri de farklıdır. Sildenafilin yemekle (özellikle yağlı yemekler) birlikte alındığında maksimum plazma konsantrasyonunun %30'a kadar azalabileceği belirtilmiştir (194). Yemeklerin tadalafil üzerinde böyle bir etkisinin olmadığı bilinmektedir (195).

PDE-5 inhibitörleri, özellikle kardiyoloji literatüründe sıkça çalışılmıştır. Yapılan hayvan modellerinde, PDE-5'in oksidatif stresle arttığı ve sol ventrikül hipertrofisine ve bu yolla kardiyak yetmezliğe yol açabileceği bildirilmiştir (196). Bu sebeple PDE-5 inhibisyonunun kalp yetmezliğinde faydalı olabileceği öne sürülmüştür. cGMP'nin ayrıca plateletler üzerinde anti-agregan etkisi olduğu da bildirilmiştir (197). Dolayısıyla anti-trombotik etkisi olduğundan bahsetmek de mümkündür. PDE-5 inhibitörlerinin kardiyak koruyucu etkileri Hoke ve ark.

tarafından çalışılmış olup araştırmacılar sildenafil ile önkoşullandırma (preconditioning) yapılan kardiyak hücrelerin iskemi/reperfüzyon hasarına daha dayanıklı olduklarını ve bu hücrelerde VEGF ekspresyonunun arttığını bildirmiştir (198). Vidavalur ve ark., sildenafilin koroner arteriolar endotel hücrelerinde VEGF ekspresyonunu arttırdığını göstermişlerdir (199).

PDE-5 inhibitörlerinin kan damarları üzerindeki etkileri, ortopedi dahil olmak üzere pek çok farklı branştaki araştırmacıların da ilgisini çekmiştir (200–203). Plastik cerrahi literatürüne baktığımızda PDE-5 inhibitörlerinin özellikle flep canlılığına katkısı açısından incelendiğini görüyoruz. Hart ve ark. sildenafilin ratlarda flep nekrozunu özellikle erken dönemde azalttığını (204), Shah ve ark. PDE-5 inhibisyonunun nikotin verilen ratlarda cilt flebi canlılığını arttırdığını (205), Liu ve ark. kronik sildenafil kullanımının rat penisindeki dokularda VEGF ekspresyonunu arttırdığını bildirmiştir (206). Huyut ve ark., tadalafilin ratların böbrek dokusunda VEGF ekspresyonunu arttırdığını göstermişlerdir (207). Sahara ve ark. PDE-5 inhibisyonunun VEGF/HIF-1 yolu üzerinden anjiogenezi arttırdığını bulmuştur (208).

PDE-5 inhibitörlerinin doğrudan kemik üzerine etkileri olabileceği de gösterilmiştir. PDE-2, 3, 4, ve 5 kemik hücrelerinde bol miktarda ekprese edilmektedir. VEGF'nin de kemik gelişimi, büyümesi ve kırık kaynaması üzerindeki olumlu etkileri bildirilmiştir (84,209–212). VEGF'nin anjiyogenez ve kemik formasyonunu ilişkilendirdiği (213), bu nedenle kemik metabolizmasında önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir (214,215). Yapılan çalışmalar PDE-5 inhibitörlerinin anjiyogenezi arttırmak suretiyle kemik mineralizasyonunu ve trabeküler kemik kalınlığını arttırdığını göstermiştir (216,217). Yaman ve ark. sildenafilin kırık kaynamasına faydalı olabileceğini (218), Subhashis ve ark. sildenafil ve vardenafilin osteopenik farelerde osteoanabolik etkisi olabileceğini öne sürmüştür (219). Song ve ark. tarafından 2017 yılında kortikosteroid ve LPS kombinasyonu ile yapılan tavşanda ON modelinde (189) de sildenafilin VEGF üzerinden femur başı kanlanmasını arttırdığı gösterilmiştir.

Biz çalışmamızda profilaktik ajan olarak tadalafil kullanarak, hem NO-cGMP-vazodilatasyon yolunda hem de tamir için gerekli olan anjiyogenez-osteogenez sürecinde, oluşturduğumuz kortikosteroid ve lipopolisakkarit modelinin olumsuz etkilerini engelleyebileceğimizi düşündük.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

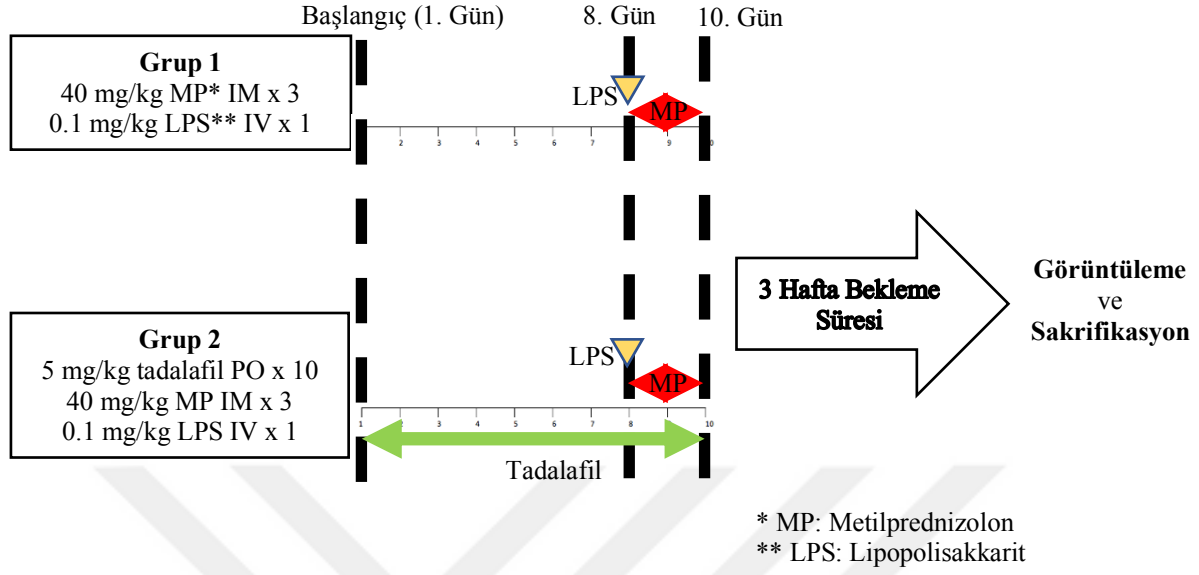
Histopatolojik inceleme

Çalışma için etik kurul onayı alındı. 28 haftalık, sağlıklı, ağırlıkları 3.7-4.2 kg arasında değişen 24 adet Yeni Zellanda tavşanından 8 tanesi (4 dişi, 4 erkek) kontrol grubu (G0) yapılarak herhangi bir işlem yapılmadı. Kalan 16 adet (8 erkek, 8 dişi) tavşan 4 dişi ve 4 erkekten oluşan 8 tavşanlık iki eşit gruba ayrıldı. Tüm tavşanlar deney süresi boyunca ayrı kafeslerde ve eşit şartlarda, 12 saat gündüz 12 saat gece siklusü olacak şekilde tutuldu. Standart laboratuvar diyeti ve su, ad libitum verildi.

Birinci gruptaki (G1) tavşanlara 0.1 mg/kg fenol ile ekstrakte edilmiş E.coli O111:B4 lipopolisakkaridi (Sigma, St. Louis, MO, USA) marjinal kulak veninden intravenöz olarak uygulandı (Resim 16). Ardından aynı gün başlamak üzere, üç gün üst üste 40 mg/kg metilprednizolon sodium süksinat (MP) intramüsküler olarak uygulandı. Bu gruptaki hayvanlar son MP enjeksiyonundan 3 hafta sonra sakrifiye edildi.



Resim 16: İntravenöz lipopolisakkarit uygulaması için marjinal kulak veninden damar yolu açılması



Şekil 8: Çalışma yönteminin şeması



Resim 17: Kıl testere ile femur başı midkoronal hattan ikiye ayrıldıktan sonra makroskopik görünüm

İkinci gruptaki tavşanlara 10 gün boyunca 5 mg/kg Tadalafil (Cialis®) mide lavajı yöntemi ile verildi (Resim 18). Tadalafil tedavisinin 8. gününde bu gruptaki tavşanlara da G1'deki tavşanlar gibi 0.1 mg/kg LPS verildikten sonra aynı gün başlamak üzere 3 gün boyunca günlük 40 mg/kg IM MP uygulaması yapıldı. G2'den iki tavşan son MP enjeksiyonundan 6 ve 9 gün sonra ex oldu ve 2 haftadan kısa sürede ex olması sebebiyle çalışmadan çıkarıldı. Son MP uygulamasından 3 hafta sonra kalan hayvanlar yüksek doz ketamin ile sakrifiye edildi. Çalışma yöntemi Şekil 8'de gösterilmiştir.



Resim 18: Mide lavajı ile tadalafil çözeltisinin verilmesi

Sakrifikasyon sonrası 1 saat içinde MR görüntüleme yapıldı. Daha sonra her iki femur çıkartıldı. AP ve lateral grafiler çekildi. Otomatik kıl testere ile femur başı koronal planda ikiye bölündükten sonra küçük parça sıvı azota atılarak 3 dk bekletildi. Daha sonra her yarım femur başı parçası ayrı eppendorf tüplerine yerleştirilerek -80° C’de moleküler biyolojik inceleme için muhafaza edildi. Kalan femurlar trokanter minör seviyesinin yaklaşık 5mm distalinden kesilerek proksimal parça %10 tamponlanmış formaldehid solüsyonunda 1 hafta bekletildi. Daha sonra %10 etilenediamintetraasetat ile dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyon sonrası femur başlarında parafin bloklara yerleştirildi ve 4 mmlik kesitler alındı. Kesitler hematoksilen eozin ile boyandı ve ışık mikroskobu ile FBAVN ile uyumlu değişikliklerin varlığı kıdemli kemik yumuşak doku patoloğu tarafından incelendi.

Radyolojik inceleme

MR görüntüleri hangi kalçalarda histopatolojik olarak doğrulanmış nekroz olduğunu bilmeyen kıdemli bir kas iskelet radyoloğu tarafından, tek kör olarak yorumlandı. MR’da eklemden efüzyon ve kemikte sinyal değişikliğine bakıldı.

Moleküler Biyolojik İnceleme

a. Protein İzolasyonu

Sıvı azot ile dondurulup -80°C’de saklanan dokulardan protein izolasyonu gerçekleştirildi. Bunun için ilk olarak, dokular küçük parçalara bölündü ve yaklaşık 300 mg olacak şekilde tartıldı. Tartılan dokular havana alınarak sıvı azot yardımıyla ezildi, toz haline getirildi ve 1,5 mL mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. 300 mg dokuya 1 mL RIPA solüsyonu eklendi. Proteinlerin degrade olmamaları için proteaz inhibitörleri ve proteinlerin stabilizasyonu için sodyum ortovanadat kullanıldı. Toz halindeki dokuyu ve solüsyonu içeren tüp vorteksenerek homojenize edildi. Tüp 5 dk buz üzerinde bekletildi, tekrar vortekslendi ve -80°C’de gece boyu bekletildi. Ertesi gün 10000 x g’de, 4° C’de, 20 dk boyunca santrifüj edildi, supernatant önceden soğutulmuş tüplere aktarıldı. Protein konsantrasyonları bişinkoninik asit (BCA) yöntemine göre ölçüldü (220).

b. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Protein süspansiyonu, kuyucuk başına 50 µg protein olacak şekilde (%4-20 Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels) 2x Laemmli solüsyonu ile 1:1 oranında karıştırıldı ve negatif yükle

yüklendi. Dikey elektroforez sabit voltajda (120 V), boyaya ait bant jelin alt kenarına 2-3 mm kalana dek (yaklaşık 70 dakika) yürütüldü.



Resim 19: Laemmlı buffer ile hazırlanan örneklerin dikey elektroforezde yürütülmesi

c. Blotlama ve Antikor İnkübasyonu

Elektroforez sonrası molekül ağırlıklarına göre ayrılan proteinler, yarı kuru transfer sistemi kullanılarak poliviniliden diflorür (PVDF) membrana (Trans-Blot® Turbo™ RTA Mini PVDF Transfer Kit) aktarıldı. Blotlama işleminin ardından membranda saptanmak istenen antijene bağlanacak olan primer antikorlar (Anti-VEGF antibody, Abcam, MA, ABD ve Anti-Beta Aktin antibody, Cell Signaling) %5 süt tozu içerisinde 1:1000 oranında hazırlandı ve membranın üzerine yayılarak +4°C’de sallanarak gece boyu bekletildi. Ardından 1XTBST ile 5 dakika boyunca 5 kere yıkanan membranların üzerine, %5 süt tozu içerisinde hazırlanan sekonder antikor (Goat Anti-

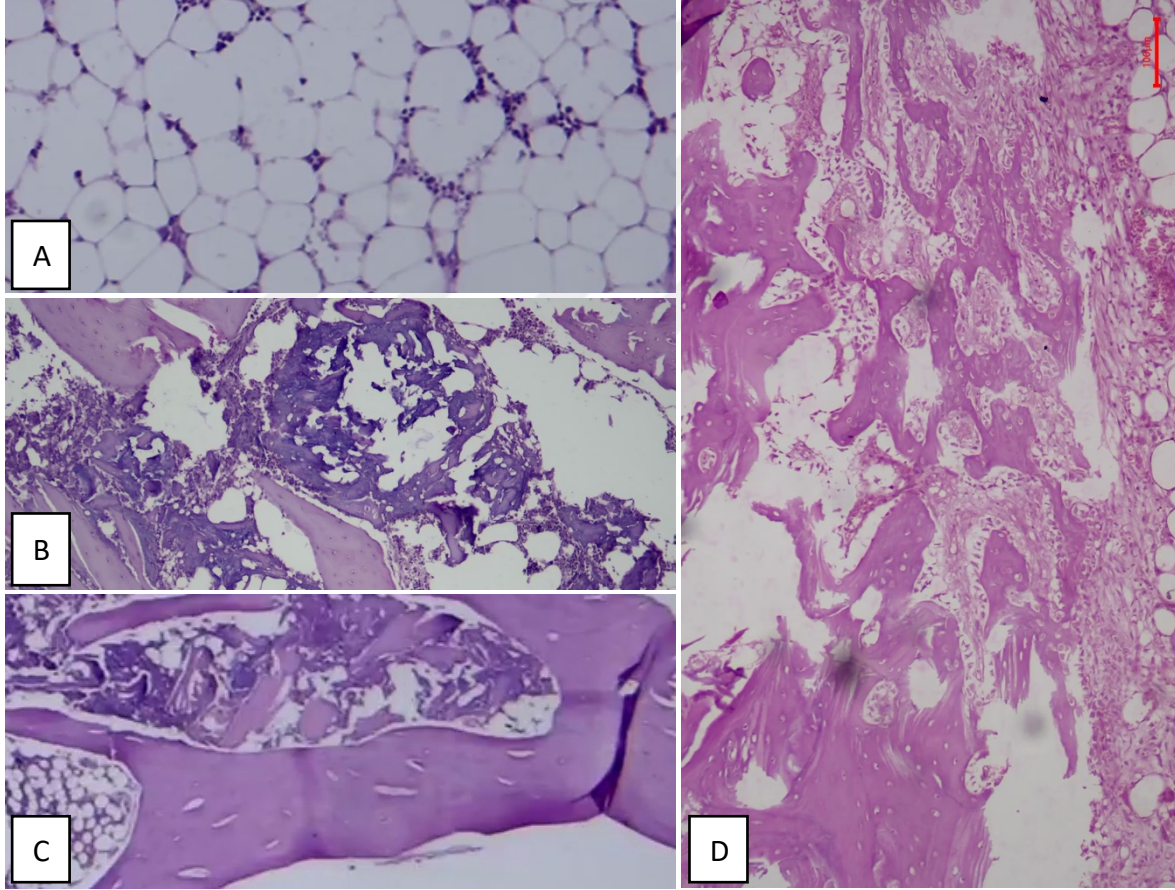
Mouse, Abcam) yayıldı ve oda sıcaklığında sallanarak 1 saat boyunca bekletildi. Membran 1XTBST ile yıkandıktan sonra üzerindeki bantlar kemilüminesans kit (Clarity Western ECL Substrate, Biorad, CA, ABD) kullanılarak görüntüleme cihazı ile görüntülendi ve derecelendirilmesi ImageJ (Ulusal Sağlık Enstitüsü, ABD) programı ile yapıldı. Her bir örneğin protein ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için, ilgili örneğin beta aktin (house-keeping protein) ekspresyon düzeyleri ile normalizasyon yapıldı ve VEGFA protein ekspresyon seviyelerindeki değişimler belirlendi.

İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz değerlendirmelerinde iki grup arasındaki karşılaştırmalar için Student's t test ve Mann Whitney-U test kullanıldı. Analizler % 95 güven aralığında, GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, CA, ABD) programı kullanılarak gerçekleştirildi. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

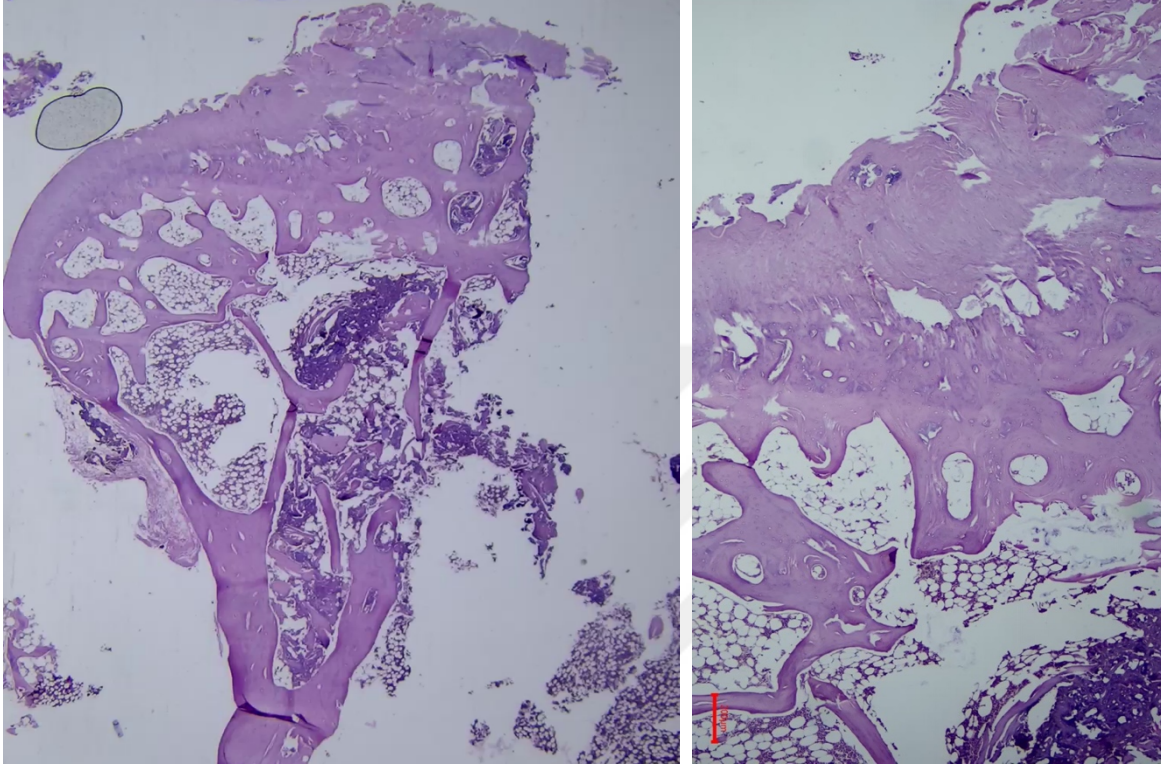
G0'daki tavşanların hiçbirinin kalçasında patoloji görülmedi. G1'de 8 tavşanın 16 kalçasından 15'inde (%94) nekroz görüldü. Buna karşılık G2'de 6 tavşanın 12 kalçasından 8'inde (%67) nekroz görüldü. Ki-kare testi sonucunda aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu ($p>0.05$). G2'de nekroz görülmeyen 4 spesimen 2 tavşana ait idi. Nekroz görülen 23 kalçadan 16 tanesinde nekroz tipi Arlet ve Durroux Tip 2 (%70), 5 tanesinde Arlet ve Durroux Tip 3 (%22), 2 tanesinde Arlet ve Durroux Tip 4 (%9) idi.



Resim 20: G1 ve G2'den farklı Arlet-Durroux evrelerini gösteren görüntüler. (A) Arlet ve Durroux Tip 1, (B) Arlet ve Durroux Tip 2, (C) Arlet ve Durroux Tip 3, (D) Arlet ve Durroux Tip 4

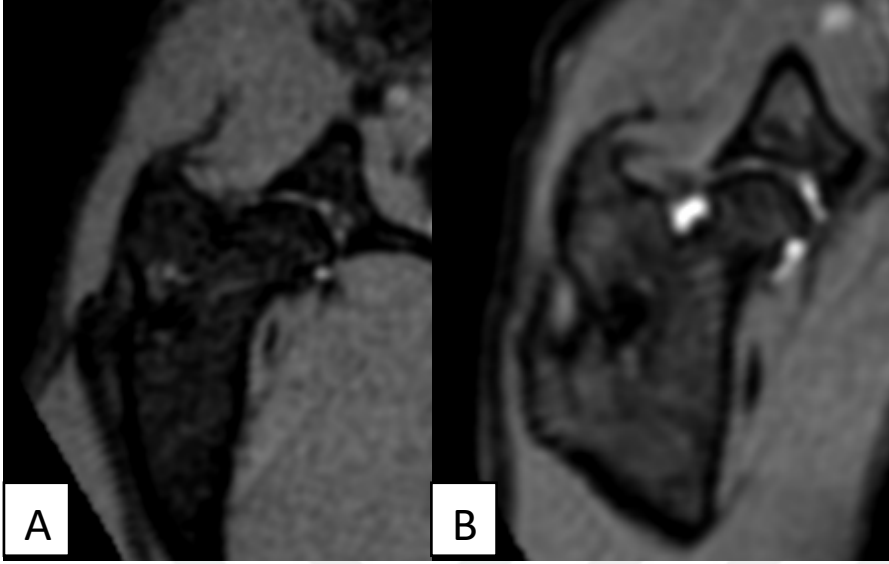
Lokasyonlarına göre incelendiğinde G1'de 15 ON+ proksimal femurun 13'ünde lezyon metafizde (%87), 8'inde (%53) ise subkondral alanda (epifiz) idi. G2'de 8 ON+ proksimal femurun 7'sinde lezyon metafizde, (%88), 2'sinde ise subkondral (%25) alanda idi. G2'de, G1'e göre

subkondral alanda daha az nekroz görülmesi (%53'e %25) Ki-kare testine göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$).

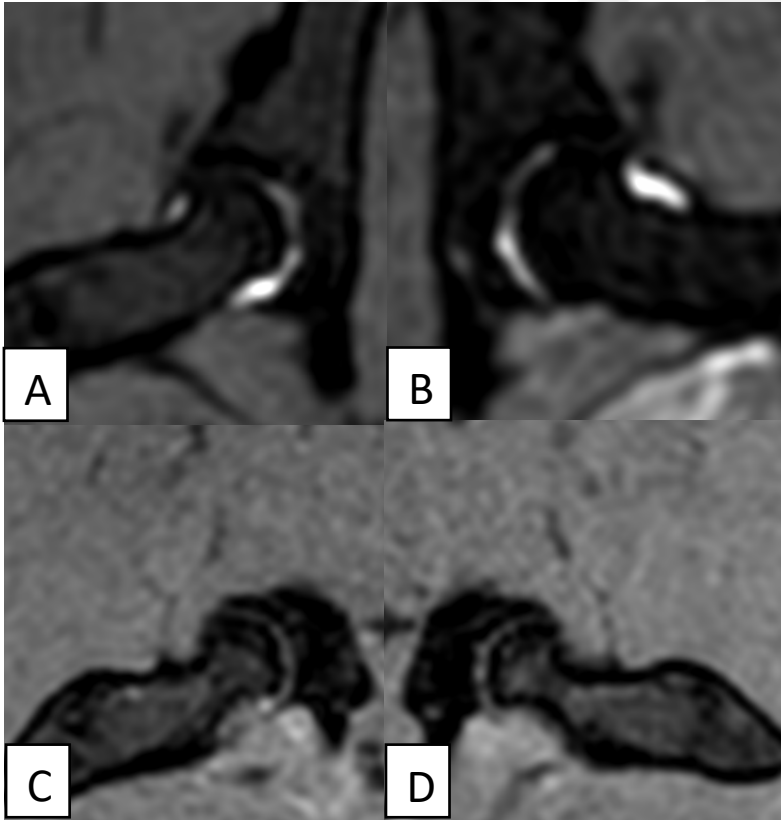


Resim 21: Metafizler ve subkondral alanlarda nekroz görüntüsü. (A) Subkondral kollaps mevcut (Hematoksilen&Eozin. 1X büyütme). (B) Aynı alanın daha yakından görünümü (H&E, 4X büyütme)

Bilateral kalça eklemi efüzyonu 14 tavşanın 13'ünde mevcut idi (Resim 22). Gruplar arasında efüzyon açısından anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$). G1'de 1 tavşanda T1 sekansında bilateral hipointens epifiz görüldü. T2'de toplam 28 kalçanın 17'sinde femur başında fokal ödem görüldü ve lezyon varlığı olarak yorumlandı (Resim 23). Histopatolojik olarak şekilde doğrulanan lezyonlar ve tek kör yapılan radyolojik değerlendirme sonuçları ile pozitif ve negatif prediktif değer hesaplamak için 2x2'lik bir tablo oluşturuldu (Tablo 6). Bu tabloya göre MR'ın pozitif prediktif değeri %89, negatif prediktif değeri %70 olarak hesaplandı.



Resim 22: Eklem için efüzyon olmayan (A) ve olan (B) iki tavşanın koronal T2 MR kesiti



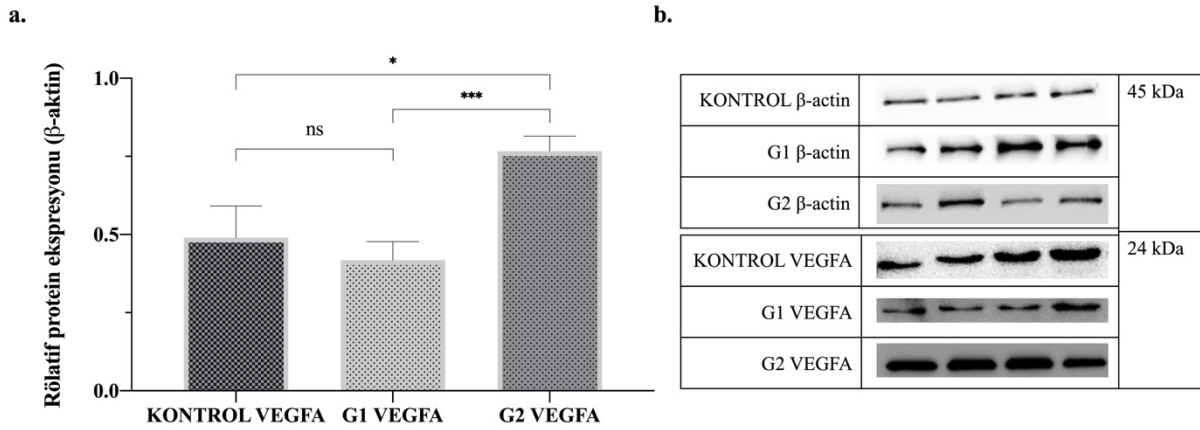
Resim 23: Üç farklı tavşana ait MR kesitleri. (A) ve (B) histolojik olarak kanıtlanmış nekrotik lezyon olmayan iki farklı tavşana ait. (C) ve (D) histolojik olarak kanıtlanmış bilateral nekroz alanı olan aynı tavşanın sağ ve sol kalçası. Her iki başın epifizinin ortasında fokal hipertens odak bulunmaktadır.

Tablo 7: MR’da saptanan ve histolojik olarak doğrulanan lezyonların dağılımı

	Histoloji (+)	Histoloji (-)
MR (+)	16	2
MR (-)	3	7

Moleküler Biyolojik Sonuçlar

Yapılan analizlerde G2 grubunda VEGFA protein ekspresyon seviyelerinin kontrol ve G1 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükseldiği görüldü (sırasıyla $p<0.0398$ ve $p<0.0004$) (Şekil 9 a). VEGFA protein ekspresyon seviyeleri G2 grubunda kontrol grubuna göre 1,55 kat, G1 grubuna göre 1,85 kat artmış olarak gözlemlendi (Şekil 9 b). Bununla birlikte G2 grubunun internal kontrolü olan beta aktini ile kıyaslandığında VEGFA ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı gözlemlendi ($p<0.0009$). Kontrol ve G1 grupları arasında VEGFA protein ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).



Şekil 9: VEGF ekspresyonu analizi a) Kontrol, G1 ve G2 gruplarında VEGFA protein ekspresyon seviyelerinin istatistiksel olarak analizi b) VEGFA protein ekspresyon seviyelerinin western blot yöntemiyle dansitometrik olarak belirlenmesi (ns: anlamsız, * $p<0.05$ ve *** $p<0.001$)

5. TARTIŞMA

Çalışmamızın hedeflediği hasta grubu, özellikle çocukluk çağı maligniteleri veya romatolojik hastalıklar gibi tedavi çerçevesinde yüksek doz kortikosteroid alması planlanan hastalardır. Bu hasta grubunda steroid ilişkili osteonekroz riski normal popülasyona göre anlamlı oranda yüksek olmakla beraber, ne yazık ki bugün için kanıtlanmış bir profilaksi bulunmamaktadır.

Steroid ilişkili osteonekroz, henüz tam anlamıyla patofizyolojisi aydınlatılamamış bir hastalıktır. Muhtemel patofizyolojik mekanizmalara yönelik, profilaksi amaçlı farklı ilaçlar denenmiş olup başarılı sonuçlar bildirilse de, klinik kullanıma giren bir ajan henüz mevcut değildir. Literatürü incelediğimizde fosfodiesteraz inhibitörlerinin deneysel osteonekroz araştırmalarında neredeyse hiç kullanılmamış olduğunu görüyoruz. 2017 yılında tavşanda osteonekroz modelinde sildenafilin terapötik etkisini araştırmış olan Song ve ark., osteonekroz modellerinde PDE-5 inhibisyonunu inceleyen hiçbir yayın bulamadıklarını bildirmişlerdir (189).

Fosfodiesteraz inhibitörlerinin osteonekroz modellerinde kullanımını literatürde araştırdığımızda maksillofasiyal cerrahi alanında pentoksifilin tedavisi amacıyla kullanımının bildirildiğini görüyoruz (221,222). Profilaktik kullanımının ise sadece Ülker ve ark. tarafından yayınlanan 2017 tarihli çalışmada incelendiğini gördük (223). 2021 Mart itibarıyla İngilizce literatürde ‘avascular necrosis’, ‘osteonecrosis’, ‘sildenafil’, ‘tadalafil’ ve ‘phosphodiesterase inhibitors’ anahtar kelimeleriyle yaptığımız taramada Song ve ark. çalışmasına (189) ek olarak sadece Pessoa ve ark.’nın ratlar üzerinde travmatik ON modelinde sildenafil kullandığı çalışmayı bulduk (224). Song ve ark. çalışmasında kortikosteroid ve LPS uygulandıktan 3 hafta sonra sildenafil verildiğini, Pessoa ve ark. çalışmasında ise sildenafilin cerrahi girişimden sonra vermeye başlandığını görüyoruz. Tadalafil ve osteonekroz ile ilgili herhangi bir çalışma bulamadık. Dolayısıyla, bizim görüşümüze göre bu çalışma, literatürde hem fosfodiesteraz inhibitörlerinin osteonekroz modellerinde profilaktik etkisinin incelendiği, hem de tadalafilin osteonekroz modelinde kullanıldığı ilk çalışmadır.

Çalışmamız öncelikle literatürde son zamanlarda sık kullanılan bir osteonekroz modeli olan lipopolisakkarid ve kortikosteroid kombinasyonunun literatürde bildirilen şekilde uygulanmasıyla başarılı ve öngörülebilir bir şekilde osteonekroz modeli oluşturulabileceğini göstermektedir. Ne var ki, literatürde bildirilen modellere benzer şekilde, subkondral kollaps sadece iki proksimal

femurda görülmüştür. Dolayısıyla bu model mevcut haliyle ileri evre osteonekroz üzerine çalışmak için uygun bir model olmayabilir.

Çalışmamızın en önemli sınırlayıcı özelliği bir hayvan modeli olmasıdır. Literatürde pek çok farklı hayvanda steroid ilişkili ON modeli çalışılmıştır. Bunların tavuk ve emu dışında tamamı quadruped hayvanlardır. Dolayısıyla en başta biyomekanik olarak önemli farklılıklar vardır. Bu nedenle bipedal hayvanların kullanılması daha uygun olabilir. Conzemius ve ark., emular ile yaptıkları çalışmada cerrahi işlem ile yapılan ON sonrası insanlarına benzer şekilde ve istikrarlı olarak ilerleyici ON elde edebildiklerini bildirmişlerdir (225). Yine literatürü incelediğimizde tavşanlarda insanlardaki şekilde subkondral kollaps ve dejeneratif artrozun takip ettiği ilerleyici bir ON yaratılamamış olduğunu görüyoruz. Kabata ve ark., insandaki ON'nin aksine, tavşandaki ON modellerinde lezyonların epifizden ziyade metafiz ve diyafizin medial tarafında geliştiğini ve lezyonları kollapsa sebep olmadığını öne sürmüşlerdir(89). Matsui ve ark. da, sadece kortikosteroid ile yapılan pek çok çalışmada yağ embolisi (166), yağ hücrelerinin boyutunda artış (158) ve osteositlerin yağlı dejenerasyonunun (226) görülmesine rağmen ON oluşturulamadığına dikkat çekmiştir (184). Onların at serumu ile yaptıkları modelde de lezyonlar epifiz yerine metafiz ve diyafizde görülmüştür. Ayrıca metafiz ve diyafizde vaskülitte bağlı damarsal değişiklik görmelerine rağmen tavşan epifizlerindeki damarlarda patolojik değişiklik bulamamışlardır. Buna tavşanın femur başındaki arteriollerin, vaskülitlerin ve kortikosteroid tedavisinin etkilediği damarlardan daha küçük kalibrede olmasının sebep olabileceğini öne sürmüşlerdir. Bizim çalışmamızda 23 ON+ proksimal femurun 10'unda lezyon subkondral alanda yer almaktaydı. Damarlarda histopatolojik incelemede anlamlı değişiklik izlenmedi.

Biz mevcut çalışmaya başlamadan yaptığımız ön çalışmada toplam 8 tavşan üzerinde sadece kortikosteroid (4 tavşan 8 kalça), kortikosteroid ve düşük doz LPS (2 tavşan, 4 kalça), ve kortikosteroid ve yüksek doz LPS modelini (2 tavşan, 4 kalça) denedik. Sadece kortikosteroid ile yaptığımız ön çalışmada ON gözlemlemedik. Kortikosteroid ve düşük doz LPS (0.01 mg/kg) ve kortikosteroid ve yüksek doz LPS (0.1 mg/kg) modellerinde ise ON gözlemledik (%50'ye %100). Toplam tavşan sayımız genel olarak literatüre göre daha az olduğundan tip 2 hata olasılığını en aza indirmek için çalışmaya yüksek doz LPS modeli devam etme kararı alındı.

Literatürü incelediğimizde, yüksek doz LPS kullanmanın en önemli dezavantajının yüksek hayvan kaybı oranı olduğunu görüyoruz. Çalışmamızda hepsi profilaksi grubunda (G2) olmak

üzere toplam 2 tavşan kaybedildi. Bu oran, kontrol grubu hariç bırakıldığında, kortikosteroid ve LPS verilen tavşanların %12.5'ine denk gelmektedir (2/16). Yamamoto ve ark.'nın sadece 20 mg/kg IM metilprednizolon asetat verdikleri 30 tavşandan, 2. ve 3. haftalarda toplam 4'ü ölmüştür (%13.3) (168). Qin ve ark.'nın düşük doz LPS ile yaptıkları çalışmada 14 tavşandan ölen olmamıştır (186). Fisher ve ark.'nın 60 adet tavşana sadece metilprednizolon verdikleri çalışmada 9'u ölmüştür (%15) (166). Jaffe ve ark., sadece uzun süreli steroid verdikleri 30 tavşandan 7'sinin (%23) öldüğünü bildirmiştir. Çalışmamıza yakın doz kullanan Yamamoto ve ark.'nın (180), 0.1 mg/kg dan 24 saat arayla iki kere LPS enjeksiyonu (kümülatif doz 0.2 mg/kg) yaptığı çalışmada LPS alan 20 tavşandan 8'i ölmüştür (%40). Çalışmamıza da ilham veren, Song ve ark.'nın 2017 yılında AOTT'de yayınlanan makalesinde 0.01mg/kg LPS ve 3 kere 20 mg/kg MPS verilen toplam 45 tavşanın 9'u ölmüştür (%20). Bu oranlar ile karşılaştırıldığında ölüm oranımız beklenen aralıktadır.

Literatürde tadalafil kullanılan çalışmalarda farklı dozların kullanıldığını görüyoruz. Toğral ve ark. Wister albino sıçanlarında yaptıkları çalışmalarda 1 mg/kg dozunu seçerken (227), metabolik sendromla ilişkili prostat değişikliklerini inceleyen Morelli ve ark. 2mg/kg dozunu kullanmışlardır (228). Yeni Zellanda beyaz tavşanlarında yapılan bir başka çalışmada ise 6 mg/kg tadalafil kullanıldığını görüyoruz (200). Biz, çalışmamızda 5 mg/kg dozunu tercih ettik. Tadalafile bağlı olabilecek bir yan etki gözlemlemedik.

Literatürdeki benzer tavşan çalışmalarını incelediğimizde oral yolla kullanılan bir ilaç olan tadalafilin farklı yollarla verildiğini görüyoruz. Morelli ve ark., içme suyuna karıştırma yöntemini seçmişlerdir (228). Biz çalışmamızda ad libitum diyet modelini kullandığımız için günlük dozu sağlıklı olarak takip edebilmek adına bu yöntemi tercih etmedik ve ilacın uygulamasını kendimiz yaptık. Narin ve ark., oral besleme sırasında hayvanları tutucuya koyduklarını bildirmişlerdir (200). 20 mg'lık tabletleri uygun doza denk gelecek şekilde parçalayarak vermeye çalıştığımızda hayvanların daha fazla direnç gösterdiğini ve bazı hayvanların ilacı tükürmesi/yutmaması sebebiyle etken madde kaybı olabildiğini gördük. Deneyimli bir veteriner hekim eşliğinde yapılan ilaç uygulaması sırasında hayvanların tükürmese dahi tabletleri ağızlarında tutabildiğini ve kafesine geri koyduğunda ağızından çıkarabildiğini gördük. Aynı şekilde enjektör ile verildiğinde tükürme sebebiyle farklı miktarlarda etken madde zayıyatı ile karşılaştık. Tabletlerin etrafındaki kaplamayı bistüri ile kazıdıktan ve ince toz forma getirdiğimizde içme suyunda çözünürlüğünün

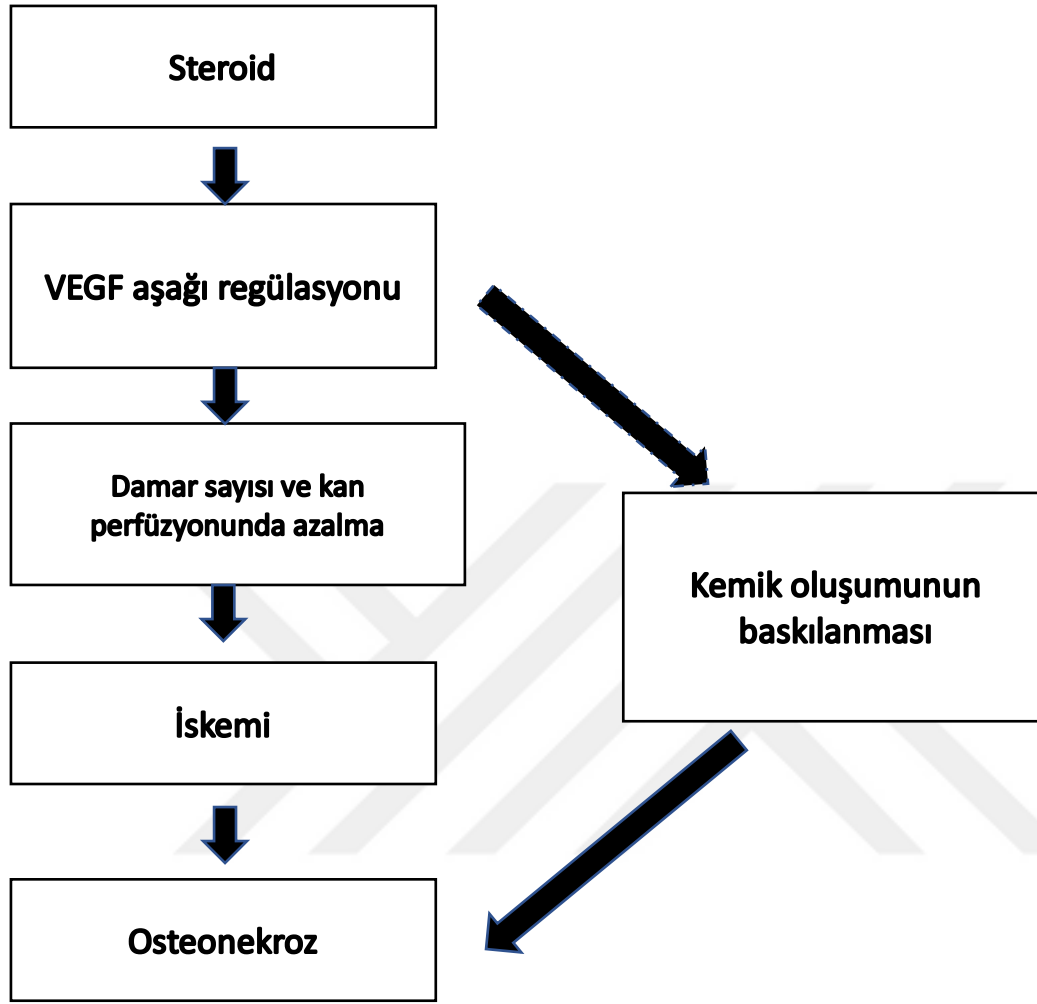
yeterli olması sayesinde, hesapladığımız dozu yaklaşık 4 cc içme suyu içinde çözdük. Daha sonra 5 cc'lik bir enjektörün ucuna taktığımız lavaj kanülü ile ilacı verdiğimizde hem etken madde kaybını en aza indirdik hem de beslemeyi tek araştırmacı ile güvenli bir şekilde yapabildik.

Tartışmalı bir diğer konu osteonekrozun gelişim süresi ile bağlantılı olarak uygun sakrifikasyon zamanıdır. Kabata ve ark (2005) SİON modelinde 85 dişi Japon Beyaz Tavşanı'nı farklı tarihlerde sakrifiye ederek ON gelişme oranlarını incelemiştir (89). Steroid enjeksiyonundan 3 gün sonra kesilen tavşanlarda ON nekroz bulunmazken 1 haftadan sonra kesilen tavşanlarda görülmüştür. 1. haftadan 2. haftaya kadar sıklığı artmış ve 2. haftadan sonra plato çizmiştir. 1 ile 8 hafta arasında kesilen tavşanlarda ON sıklığı, sayısı ve alan büyüklüğü açısından istatistiksel farklılık görmemişlerdir. Bu bulgular ışığında bu tavşan modelinde SİON'un yaklaşık birinci haftada oluştuğu sonucuna varmışlardır. Literatürü incelediğimizde de 3. haftada sakrifikasyonun uygun bir tarih olduğunu görmekteyiz (68)

Çalışmamızda profilaktik tadalafil verilen grupta (G2), tadalafil verilmeyen gruba göre (G1) nekroz oranı düşük çıkmıştır (%66'ya %93). Ne var ki bu veri istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$). Bunu öncelikle hayvan sayımızın azlığına bağlıyoruz. Çalışmamızın en dikkat çekici sonucu ise tadalafil profilaksisi verilen grupta, kontrol grubuna ve G1'e göre, VEGF ekspresyonundaki anlamlı artıştır (sırasıyla $p<0.05$ ve $p<0.001$).

Kabata ve ark. tavşanlarda yaptıkları SİON modelinde kortikosteroid verilen tavşanlarda VEGF'nin ilk bir hafta içinde geçici olarak arttığını, 2 hafta ve sonrasında ise neredeyse normale döndüğünü bulmuştur (229). Bizim modelimizde G1'in VEGF ekspresyonunun kontrol grubuyla aynı çıkması bu sonuçlarla uyumludur. Dolayısıyla G2'deki VEGF ekspresyonu artışının steroidlerin yaptığı hasara yönelik anjiyogenez ve osteogenezin göstergesi olarak değil, tadalafilin bağımsız etkisi olarak yorumlamak gerektiğini düşünüyoruz.

VEGF'nin osteonekroz patofizyolojisindeki kritik rolü Wang ve ark.'dan adapte edilen Şekil 10'da özetlenmiştir (96). Literatürde anti-VEGF tedavisine bağlı bildirilen osteonekroz vakaları bulunmaktadır (100). Öte yandan farklı araştırmacılar tarafından VEGF'nin kendisinin osteonekrozda potansiyel bir tedavi olabileceği bildirilmiştir (102,103). Bu bulgular doğrultusunda tadalafilin osteonekroz araştırmalarında daha fazla sayıda tavşanla ve farklı protokollerle profilaktik ve tedavi edici etkisinin araştırılmasının umut verici olduğunu düşünüyoruz.



Şekil 10: Tavşanlarda steroid ilişkili osteonekrozun patofizyolojisi

Elde ettiğimiz sonuçların, özellikle de tadalafilin femur başında eksprese edilen VEGF üzerindeki etkisinin, literatüre anlamlı bir katkı yapacağına inanıyoruz. Bir sonraki aşama, tedavi gruplarını da içerecek daha kapsamlı çalışmalarla, tadalafilin VEGF üzerindeki etkisinden, yüksek doz steroid alması beklenen hastalarda profilaksi veya tedavi amacıyla nasıl faydalanabileceğini daha detaylı incelemektir.

6. ÇIKARIMLAR VE ÖNERİLER

Osteonekroz, tam olarak patofizyolojisi ortaya konamamış bir hastalık olup özellikle ileri evre femur başı osteonekrozunu tekrarlanabilir şekilde oluşturacak bir hayvan modeli henüz mevcut değildir. Bununla birlikte, literatürde bildirilen şekilde lipopolisakkarid ve steroid kombinasyonunu kullanarak %94 başarı ile erken evre osteonekroz oluşturduk.

Tadalafil profilaksisi yaptığımız grup ile (G2), yapmadığımız grup arasında (G1) nekroz oranları açısından görünürde bir fark olmasına rağmen (%66'ya %94) bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bu farkın öncelikle spesimen sayımızın azlığından kaynaklandığını ve araştırılmaya değer olduğunu düşünüyoruz.

Çalışmamızın en dikkat çekici sonucu ise tadalafilin VEGF üzerindeki etkisidir. Tadalafil profilaksisi verilen grupta VEGF ekspresyonunun anlamlı olarak artmış olması iki açıdan dikkat çekicidir. Öncelikle bu artış, G1 ve kontrol grubu arasında anlamlı fark olmamasını göz önüne alırsak, lipopolisakkarid ve steroidin yarattığı hasardan bağımsızdır. Öte yandan, bu etki son tadalafil tedavisinin verilmesinden 3 hafta sonra dokuda saptanmıştır.

Güncel çalışmalar VEGF'nin baskılanmasının osteonekroz patolojisinin bir parçası, öte yandan VEGF'nin kendisinin de tamir sürecinin önemli bir parçası olduğunu göstermektedir. Biz bu çalışmada tadalafilin sadece koruyucu etkisini araştırdık. Bununla birlikte, VEGF'nin osteogenez ve anjiyogenezdeki rolü dikkate alındığında, tadalafilin yarattığı VEGF ekspresyonu artışının olası bir tedavi edici etkisinin bulunması da mümkündür. Dolayısıyla bir sonraki adım, bu çalışmanın daha fazla sayıda tavşanla, farklı tadalafil dozlarıyla ve profilaksi grubuna ek olarak bir tedavi grubuyla tekrarlanmasıdır. Bu, tadalafilin, olası profilaktik veya tedavi edici etkisinin ayırt edilmesine olanak verebilir.

8. KAYNAKLAR

1. Kim T-H, Hong JM, Lee J-Y, Oh B, Park EK, Lee C-K, et al. Promoter polymorphisms of the vascular endothelial growth factor gene is associated with an osteonecrosis of the femoral head in the Korean population. *Osteoarthr Cartil.* 2008;16(3):287–91.
2. Koo K, Lee JS, Lee YJ, Kim K, Yoo JJ, Kim HJ. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in patients with nontraumatic femoral head osteonecrosis. *J Orthop Res.* 2006;24(8):1722–8.
3. Drake R, Vogl AW, Mitchell AWM, Tibbitts R, Richardson P. *Gray's Atlas of Anatomy E-Book.* Elsevier Health Sciences; 2020.
4. Hunter W. Of the structure and diseases of articulating cartilages, by William Hunter, surgeon. *Philos Trans.* 1742;42:514–21.
5. Trueta J, Harrison MHM. The normal vascular anatomy of the femoral head in adult man. *J Bone Joint Surg Br.* 1953;35(3):442–61.
6. Sheehan SE, Shyu JY, Weaver MJ, Sodickson AD, Khurana B. Proximal femoral fractures: what the orthopedic surgeon wants to know. *Radiographics.* 2015;35(5):1563–84.
7. Crock H V. A revision of the anatomy of the arteries supplying the upper end of the human femur. *J Anat.* 1965;99(Pt 1):77.
8. Chung SM. The arterial supply of the developing proximal end of the human femur. *J Bone Joint Surg Am.* 1976;58(7):961–70.
9. Gautier E, Ganz K, Krügel N, Gill T, Ganz R. Anatomy of the medial femoral circumflex artery and its surgical implications. *J Bone Joint Surg Br.* 2000;82(5):679–83.
10. Crock H V. An atlas of the arterial supply of the head and neck of the femur in man. *Clin Orthop Relat Res.* 1980;152:17–27.
11. Jedral T, Anyzewski P, Cizek B, Benke G. Vascularization of the hip joint in the human fetuses. *Folia Morphol (Warsz).* 1996;4(55).
12. Zlotorowicz M, Czubak J. Vascular anatomy and blood supply to the femoral head. In: *Osteonecrosis.* Springer; 2014. p. 19–25.
13. HOWE JR WW, THOMAS LACEY II, SCHWARTZ RP. A study of the gross anatomy of the

- arteries supplying the proximal portion of the femur and the acetabulum. *JBJS*. 1950;32(4):856–66.
14. Judet J, Judet R, Lagrange J, Dunoyer J. A study of the arterial vascularization of the femoral neck in the adult. *JBJS*. 1955;37(4):663–80.
 15. Tucker FR. Arterial supply at the femoral head and its clinical importance. *J Bone Joint Surg Br*. 1949;31(1):82–93.
 16. Zlotorowicz M, Czubak J, Kozinski P, Boguslawska-Walecka R. Imaging the vascularisation of the femoral head by CT angiography. *J Bone Joint Surg Br*. 2012;94(9):1176–9.
 17. Zlotorowicz M, Szczodry M, Czubak J, Ciszek B. Anatomy of the medial femoral circumflex artery with respect to the vascularity of the femoral head. *J Bone Joint Surg Br*. 2011;93(11):1471–4.
 18. Sevitt S, Thompson RG. The distribution and anastomoses of arteries supplying the head and neck of the femur. *J Bone Joint Surg Br*. 1965;47(3):560–73.
 19. Lo D, Talkad A, Sharma S. Anatomy, Bony Pelvis and Lower Limb, Fovea Capitis Femoris. *StatPearls* [Internet]. 2020;
 20. Koo K-H, Lee Y-K, Lee YJ. Pathophysiology of Ischemic Diseases of the Hip: Osteonecrosis, Borderline Necrosis, and Bone Marrow Edema Syndrome. In: *Osteonecrosis*. Springer; 2014. p. 143–9.
 21. Claffey TJ. Avascular necrosis of the femoral head: an anatomical study. *J Bone Joint Surg Br*. 1960;42(4):802–9.
 22. Bagi CM, Berryman E, Moalli MR. Comparative bone anatomy of commonly used laboratory animals: implications for drug discovery. *Comp Med*. 2011;61(1):76–85.
 23. Wang H-H, Wang Y-XJ, Sheng H, Zhang G, Qin L, Ahuja AT, et al. Fossa trochanterica of the proximal femur in rabbits: An anatomic structure for potential misinterpretation on magnetic resonance images. *Acta radiol*. 2009;50(2):212–6.
 24. Brookes M, Harrison RG. The vascularization of the rabbit femur and tibiofibula. *J Anat*. 1957;91(Pt 1):61.
 25. Brooks M. *The blood supply of bone* Butterworth. London; 1971.
 26. Sapkas G, Pantazopoulos T, Karanikas E, Hartofilakidis-Garofalidis G. Effect of Hip Dislocation on the Blood Supply to the Femoral Head: An Experimental Study in Rabbits. *Acta Orthop Scand*. 1983;54(2):204–9.

27. Pavelka K. Osteonecrosis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2000;14(2):399–414.
28. Steinberg DR, Steinberg ME. Osteonecrosis: an overview. *Tech Orthop*. 2008;23(1):2–10.
29. Kapadia BH, Banerjee S, Cherian JJ, Jauregui JJ, Mont MA. Principles of core decompression for osteonecrosis of the hip. In: *Osteonecrosis*. Springer; 2014. p. 279–84.
30. Mont MA, Jones LC, Hungerford DS. Nontraumatic osteonecrosis of the femoral head: ten years later. *JBJS*. 2006;88(5):1117–32.
31. Luck J V. *Phatology Correlated with Roentgenological and Clinical Features*. Bone Jt Dis Springfield, Illinois Charles C Thomas. 1950;
32. Russell J. CLASSIC-ESSAY ON NECROSIS-SECTION. 1. GENERAL REMARKS, AND DESCRIPTION OF APPEARANCES. LIPPINCOTT-RAVEN PUBL 227 EAST WASHINGTON SQ, PHILADELPHIA, PA 19106; 1978.
33. Jones Jr JP, Engleman EP. Osseous avascular necrosis associated with systemic abnormalities. *Arthritis Rheum Off J Am Coll Rheumatol*. 1966;9(5):728–36.
34. Freund E. Bilateral aseptic necrosis of the femoral head: problems arising in a compensation case. *Ann Surg*. 1936;104(1):100.
35. Chandler FA. Coronary disease of the hip. *J Int Coll Surg*. 1948;11(1):34–6.
36. Mankin HJ, Brower TD. Bilateral Idiopathic Aseptic Necrosis of the Femur in Adults:" Chandler's Disease". *Bull Hosp Joint Dis*. 1962;23:42–57.
37. Sierra RJ, Grieco FR. Osteonecrosis of the femoral head. *J Am Acad Orthop Surg*. 1999;7:250–61.
38. Kelman GJ, Williams GW, Colwell Jr CW, Walker RH. Steroid-related osteonecrosis of the knee. Two case reports and a literature review. *Clin Orthop Relat Res*. 1990;(257):171–6.
39. Fordyce MJ, Solomon L. Early detection of avascular necrosis of the femoral head by MRI. *J Bone Joint Surg Br*. 1993;75(3):365–7.
40. Mont MA, Hungerford DS. Non-traumatic avascular necrosis of the femoral head. *JBJS*. 1995;77(3):459–74.
41. Steinberg ME, Steinberg DR. Osteonecrosis: historical perspective. In: *Osteonecrosis*. Springer; 2014. p. 3–15.
42. Chernetsky SG, Mont MA, LaPorte DM, Jones LC, Hungerford DS, McCarthy EF. Pathologic

features in steroid and nonsteroid associated osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res.* 1999;(368):149–61.

43. Powell C, Chang C, Naguwa SM, Cheema G, Gershwin ME. Steroid induced osteonecrosis: an analysis of steroid dosing risk. *Autoimmun Rev.* 2010;9(11):721–43.
44. Steinberg ME, Steinberg DR. Classification systems for osteonecrosis: an overview. *Orthop Clin.* 2004;35(3):273–83.
45. Assouline-Dayana Y, Chang C, Greenspan A, Shoenfeld Y, Gershwin ME. Pathogenesis and natural history of osteonecrosis. In: *Seminars in arthritis and rheumatism.* Elsevier; 2002. p. 94–124.
46. Bassoe P. THE LATE MANIFESTATIONS OF COMPRESSED-AIR DISEASE. 1. *Am J Med Sci.* 1913;145(4):526.
47. Axhausen G. Über anämische Infarkte am Knochensystem und ihre Bedeutung für die Lehre von den primären Epiphyseonekrosen. *Arch Klin Chir.* 1928;151:72–98.
48. CHUNG SMK, RALSTON EL. Necrosis of the femoral head associated with sickle-cell anemia and its genetic variants: A review of the literature and study of thirteen cases. *JBJS.* 1969;51(1):33–58.
49. Kadan-Lottick NS, Dinu I, Wasilewski-Masker K, Kaste S, Meacham LR, Mahajan A, et al. Osteonecrosis in adult survivors of childhood cancer: a report from the childhood cancer survivor study. *J Clin Oncol.* 2008;26(18):3038–45.
50. Sallmann S, Fiebig B, Hedrich CM, Heubner G, Gahr M. Systemischer Lupus erythematoses im Kindes-und Jugendalter. *Z Rheumatol.* 2006;65(7):576–86.
51. Gaynon PS, Carrel AL. Glucocorticosteroid therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Drug Resist Leuk Lymphoma III.* 1999;593–605.
52. Weinstein RS, Nicholas RW, Manolagas SC. Apoptosis of osteocytes in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the hip. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(8):2907–12.
53. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest.* 1998;102(2):274–82.
54. Sinigaglia L, Mazzocchi D, Varena M. Bone involvement in exogenous hypercortisolism. *J Endocrinol Invest.* 2008;31(4):364–70.
55. Rosenfeld S, Kim HKW. Corticosteroid-Associated Osteonecrosis in Children. In: *Osteonecrosis.*

Springer; 2014. p. 479–90.

56. PIETROGRANDE Vin. Osteopatia da prolungato trattamento cortisonico. *Ortop Traum Appar Mot.* 1957;25:791–810.
57. Arfi S, Moreau F, Heuclin C, Kreis H, Paolaggi JB, Auguier L. Aseptic osteonecrosis in renal transplantation; apropos of 29 cases. *Rev Rhum Mal Osteoartic.* 1975;42(3):162–76.
58. Hungerford DS, Zizic TM. Alcoholism associated ischemic necrosis of the femoral head. Early diagnosis and treatment. *Clin Orthop Relat Res.* 1978;(130):144–53.
59. Heimann WG, Freiburger RH. Avascular necrosis of the femoral and humeral heads after high-dosage corticosteroid therapy. *N Engl J Med.* 1960;263(14):672–5.
60. Petrigliano FA, Lieberman JR. Osteonecrosis of the hip: novel approaches to evaluation and treatment. *Clin Orthop Relat Res.* 2007;465:53–62.
61. Hungerford DS, Lennox DW. The importance of increased intraosseous pressure in the development of osteonecrosis of the femoral head: implications for treatment. *Orthop Clin North Am.* 1985;16(4):635–54.
62. Jones Jr JP, Engleman EP, Najarian JS. Systemic fat embolism after renal homotransplantation and treatment with corticosteroids. *N Engl J Med.* 1965;273(27):1453–8.
63. Wang G-J, Sweet DE, Reger SI, Thompson RC. Fat-cell changes as a mechanism of avascular necrosis of the femoral head in cortisone-treated rabbits. *JBJS.* 1977;59(6):729–35.
64. Prosnitz LR, Lawson JP, Friedlaender GE, Farber LR, Pezzimenti JF. Avascular necrosis of bone in Hodgkin's disease patients treated with combined modality therapy. *Cancer.* 1981;47(12):2793–7.
65. Shim K, MacKenzie MJ, Winkquist E. Chemotherapy-Associated Osteonecrosis in Cancer Patients with Solid Tumours. *Drug Saf.* 2008;31(5):359–71.
66. Björkman A, Svensson PJ, Hillarp A, Burtscher IM, Rünow A, Benoni G. Factor V Leiden and prothrombin gene mutation: risk factors for osteonecrosis of the femoral head in adults. *Clin Orthop Relat Res.* 2004;425:168–72.
67. Zalavras, Charalampos G Vartholomatos, George Dokou, Eleni Malizos KN. Genetic Background of Osteonecrosis. 2004;(422):251–5.
68. Fondi C, Franchi A. Definition of bone necrosis by the pathologist. *Clin cases Miner bone Metab.* 2007;4(1):21.

69. Catto M. Pathology of aseptic bone necrosis. *Aseptic necrosis bone*. 1976;3–100.
70. Koo K-H, Jeong S-T, Jones Jr JP. Borderline necrosis of the femoral head. *Clin Orthop Relat Res*. 1999;(358):158–65.
71. Koo K-H. Ficat Staging System. In: *Osteonecrosis*. Springer; 2014. p. 199–200.
72. Arlet J, Durroux R. Diagnostic histologique précoce de l'ostéonécrose aseptique de la tête fémorale par le forage-biopsie. In: *Premier symposium international de circulation osseuses*. 1973.
73. Kim S-Y, Kim T-H. Genetic Studies in Osteonecrosis of the Femoral Head. In: *Osteonecrosis*. Springer; 2014. p. 61–9.
74. Koo K-H, Kim R, Kim Y-S, Ahn I-O, Cho S-H, Song H-R, et al. Risk period for developing osteonecrosis of the femoral head in patients on steroid treatment. *Clin Rheumatol*. 2002;21(4):299–303.
75. Wang G-J, Cui Q, Balian G. The Pathogenesis and Prevention of Steroid Induced Osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res*. 2000;370:295–310.
76. Griffith JF, Antonio GE, Kumta SM, Hui DSC, Wong JKT, Joynt GM, et al. Osteonecrosis of hip and knee in patients with severe acute respiratory syndrome treated with steroids. *Radiology*. 2005;235(1):168–75.
77. Lee YJ, Lee JS, Kang EH, Lee Y, Kim S, Song YW, et al. Vascular endothelial growth factor polymorphisms in patients with steroid-induced femoral head osteonecrosis. *J Orthop Res*. 2012;30(1):21–7.
78. Al-Omari AA, Aleshawi AJ, Marei OA, Younes HMB, Alawneh KZ, Mohaidat ZM. Avascular necrosis of the femoral head after single steroid intra-articular injection. *Eur J Orthop Surg Traumatol*. 2020;30(2):193–7.
79. Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;9(6):669–76.
80. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol*. 1995;146(5):1029–39.
81. Ku DD, Zaleski JK, Liu S, Brock TA. Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am J Physiol Circ Physiol*. 1993;265(2):H586–92.

82. Yang R, Thomas GR, Bunting S, Ko A, Ferrara N, Keyt B, et al. Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1996;27(6):838–44.
83. Carano RAD, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today.* 2003;8(21):980–9.
84. Gerber H-P, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N, et al. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med.* 1999;5(6):623–8.
85. Plenck Jr H, Gstettner M, Grossschmidt K, Breitenseher M, Urban M, Hofmann S. Magnetic resonance imaging and histology of repair in femoral head osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res.* 2001;386:42–53.
86. Kim HKW, Bian H, Randall T, Garces A, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Increased VEGF expression in the epiphyseal cartilage after ischemic necrosis of the capital femoral epiphysis. *J Bone Miner Res.* 2004;19(12):2041–8.
87. Radke S, Battmann A, Jatzke S, Eulert J, Jakob F, Schütze N. Expression of the angiomatrix and angiogenic proteins CYR61, CTGF, and VEGF in osteonecrosis of the femoral head. *J Orthop Res.* 2006;24(5):945–52.
88. Kabata T, Kubo T, Matsumoto T, Nishino M, Tomita K, Katsuda S, et al. Apoptotic cell death in steroid induced osteonecrosis: an experimental study in rabbits. *J Rheumatol.* 2000;27(9):2166–71.
89. Kabata T, Kubo T, Matsumoto T, Hirata T, Fujioka M, Takahashi KA, et al. Onset of steroid-induced osteonecrosis in rabbits and its relationship to hyperlipaemia and increased free fatty acids. *Rheumatology.* 2005;44(10):1233–7.
90. Katsube K, Bishop AT, Simari RD, Ylä-Herttuala S, Friedrich PF. Vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transfer enhances surgical revascularization of necrotic bone. *J Orthop Res.* 2005;23(2):469–74.
91. Kai CAO, Huang W, Hong AN, Jiang D, Yong SHU, Han Z. Deproteinized bone with VEGF gene transfer to facilitate the repair of early avascular necrosis of femoral head of rabbit. *Chinese J Traumatol (English Ed [Internet].* 2009;12(5):269–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.3760/cma.j.issn.1008-1275.2009.05.003>
92. Guzmán-Morales J, El-Gabalawy H, Pham MH, Tran-Khanh N, McKee MD, Wu W, et al. Effect of chitosan particles and dexamethasone on human bone marrow stromal cell osteogenesis and

- angiogenic factor secretion. *Bone*. 2009;45(4):617–26.
93. Pufe T, Scholz-Ahrens KE, Franke ATM, Petersen W, Mentlein R, Varoga D, et al. The role of vascular endothelial growth factor in glucocorticoid-induced bone loss: evaluation in a minipig model☆. *Bone*. 2003;33(6):869–76.
 94. Koedam JA, Smink JJ, van Buul-Offers SC. Glucocorticoids inhibit vascular endothelial growth factor expression in growth plate chondrocytes. *Mol Cell Endocrinol*. 2002;197(1–2):35–44.
 95. Leonard MO, Godson C, Brady HR, Taylor CT. Potentiation of glucocorticoid activity in hypoxia through induction of the glucocorticoid receptor. *J Immunol*. 2005;174(4):2250–7.
 96. Wang G, Zhang CQ, Sun Y, Feng Y, Chen SB, Cheng XG, et al. Changes in femoral head blood supply and vascular endothelial growth factor in rabbits with steroid-induced osteonecrosis. *J Int Med Res*. 2010;38(3):1060–9.
 97. Ma H-Z, Zeng B-F, Li X-L. Upregulation of VEGF in subchondral bone of necrotic femoral heads in rabbits with use of extracorporeal shock waves. *Calcif Tissue Int*. 2007;81(2):124–31.
 98. Oliveira LJC, Canedo FSNA, Sacardo KP, Alessi JVM, Barbosa FG, Shimada AK, et al. Bevacizumab-associated osteonecrosis of the femur and tibia. *Oxford Med case reports*. 2019;2019(5):omz040.
 99. Wen Q, Ma L, Chen YP, Yang L, Luo W, Wang XN. Treatment of avascular necrosis of the femoral head by hepatocyte growth factor-transgenic bone marrow stromal stem cells. *Gene Ther*. 2008;15(23):1523–35.
 100. Ma X-W, Cui D-P, Zhao D-W. Vascular endothelial growth factor/bone morphogenetic protein-2 bone marrow combined modification of the mesenchymal stem cells to repair the avascular necrosis of the femoral head. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(9):15528.
 101. Hang D, Wang Q, Guo C, Chen Z, Yan Z. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with VEGF165 transgenic bone marrow mesenchymal stem cells in mongrel dogs. *Cells Tissues Organs*. 2012;195(6):495–506.
 102. van der Zee R, Murohara T, Luo Z, Zollmann F, Passeri J, Lekutat C, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation*. 1997;95(4):1030–7.
 103. Kerachian MA, Séguin C, Harvey EJ. Glucocorticoids in osteonecrosis of the femoral head: a new

- understanding of the mechanisms of action. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2009;114(3–5):121–8.
104. Mont MA, Zywiell MG, Marker DR, McGrath MS, Delanois RE. The natural history of untreated asymptomatic osteonecrosis of the femoral head: a systematic literature review. *JBJS.* 2010;92(12):2165–70.
 105. Banerjee S, Kapadia BH, Jauregui JJ, Cherian JJ, Mont MA. Natural history of osteonecrosis. In: *Osteonecrosis.* Springer; 2014. p. 161–4.
 106. Mitchell DG, Rao VM, Dalinka MK, Spritzer CE, Alavi A, Steinberg ME, et al. Femoral head avascular necrosis: correlation of MR imaging, radiographic staging, radionuclide imaging, and clinical findings. *Radiology.* 1987;162(3):709–15.
 107. Markisz JA, Knowles RJ, Altchek DW, Schneider R, Whalen JP, Cahill PT. Segmental patterns of avascular necrosis of the femoral heads: early detection with MR imaging. *Radiology.* 1987;162(3):717–20.
 108. Ryu KN, Jin W, Park JS. Radiography, MRI, CT, Bone Scan, and PET-CT. In: *Osteonecrosis.* Springer; 2014. p. 179–95.
 109. Huang G-S, Chan WP, Chang Y-C, Chang C-Y, Chen C-Y, Yu JS. MR imaging of bone marrow edema and joint effusion in patients with osteonecrosis of the femoral head: relationship to pain. *Am J Roentgenol.* 2003;181(2):545–9.
 110. Ficat RP, Arlet J. Treatment of bone ischemia and necrosis. *Ischemia necrosis bone Balt Williams Wilkins.* 1980;171–82.
 111. Steinberg M. A new method of evaluation and staging of avascular necrosis of the femoral head. *Bone Circ.* 1984;398–403.
 112. Gardeniers JWM. ARCO committee on terminology and staging. *ARCO Newsl.* 1993;5:79–82.
 113. Ono K. Diagnostic criteria, staging system, and roentgenographic classification of avascular necrosis of the femoral head (steroid induced, alcohol associated, or idiopathic nature). *Annu Rep Japanese Investig Comm intractable Dis avascular necrosis femoral head, under auspices Minist Heal Welf.* 1987;331.
 114. MARCUS ND, Enneking WF, MASSAM RA. The silent hip in idiopathic aseptic necrosis: treatment by bone-grafting. *JBJS.* 1973;55(7):1351–66.
 115. Sugioka Y. Transtrochanteric anterior rotational osteotomy of the femoral head in the treatment of

- osteonecrosis affecting the hip: a new osteotomy operation. *Clin Orthop Relat Res*. 1978;(130):191–201.
116. Kerboul M, Thomine J, Postel M, d'Aubigne RM. The conservative surgical treatment of idiopathic aseptic necrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Br*. 1974;56(2):291–6.
 117. Ficat RP. Necrosis of the femoral head. Ischemia necross bone. 1980;171–82.
 118. Steinberg ME, Hayken GD, Steinberg DR. A quantitative system for staging avascular necrosis. *J Bone Joint Surg Br*. 1995;77(1):34–41.
 119. Steinberg DR, Steinberg ME. The University of Pennsylvania classification of osteonecrosis. In: *Osteonecrosis*. Springer; 2014. p. 201–6.
 120. Gardeniers JWM, Gosling-Gardeniers AC, Rijnen WHC. The ARCO staging system: generation and evolution since 1991. In: *Osteonecrosis*. Springer; 2014. p. 215–8.
 121. Koo KH, Kim R. Quantifying the extent of osteonecrosis of the femoral head. A new method using MRI. *J Bone Joint Surg Br*. 1995;77(6):875–80.
 122. Mont MA, Salem HS, Piuizzi NS, Goodman SB, Jones LC. Nontraumatic osteonecrosis of the femoral head: where do we stand today?: a 5-year update. *JBJS*. 2020;102(12):1084–99.
 123. Sultan AA, Mohamed N, Samuel LT, Chughtai M, Sodhi N, Krebs VE, et al. Classification systems of hip osteonecrosis: an updated review. *Int Orthop*. 2019;43(5):1089–95.
 124. Mont MA, Marulanda GA, Jones LC, Saleh KJ, Gordon N, Hungerford DS, et al. Systematic analysis of classification systems for osteonecrosis of the femoral head. *JBJS*. 2006;88(suppl_3):16–26.
 125. Mont MA, Carbone JJ, Fairbank AC. Core decompression versus nonoperative management for osteonecrosis of the hip. *Clin Orthop Relat Res*. 1996;324:169–78.
 126. Glueck CJ, Freiberg RA, Sieve L, Wang P. Enoxaparin prevents progression of stages I and II osteonecrosis of the hip. *Clin Orthop Relat Res*. 2005;435:164–70.
 127. Motomura G, Yamamoto T, Miyanishi K, Jingushi S, Iwamoto Y. Combined effects of an anticoagulant and a lipid-lowering agent on the prevention of steroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis Rheum Off J Am Coll Rheumatol*. 2004;50(10):3387–91.
 128. Yamaguchi R, Yamamoto T, Motomura G, Ikemura S, Iwasaki K, Zhao G, et al. Effects of an anti-platelet drug on the prevention of steroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Rheumatology*. 2012;51(5):789–93.

129. Jones Jr JP. Fat embolism and osteonecrosis. *Orthop Clin North Am.* 1985;16(4):595–633.
130. Pengde K, Fuxing P, Bin S, Jing Y, Jingqiu C. Lovastatin inhibits adipogenesis and prevents osteonecrosis in steroid-treated rabbits. *Jt Bone Spine.* 2008;75(6):696–701.
131. Pritchett JW. Statin therapy decreases the risk of osteonecrosis in patients receiving steroids. *Clin Orthop Relat Res.* 2001;386:173–8.
132. Lai K-A, Shen W-J, Yang C-Y, Shao C-J, Hsu J-T, Lin R-M. The use of alendronate to prevent early collapse of the femoral head in patients with nontraumatic osteonecrosis: a randomized clinical study. *JBJS.* 2005;87(10):2155–9.
133. Nishii T, Sugano N, Miki H, Hashimoto J, Yoshikawa H. Does alendronate prevent collapse in osteonecrosis of the femoral head? *Clin Orthop Relat Res.* 2006;443:273–9.
134. Chen C-H, Wang G-J. Alendronate in the prevention of collapse of the femoral head in nontraumatic osteonecrosis. In: *Osteonecrosis.* Springer; 2014. p. 265–71.
135. Banerjee S, Issa K, Pivec R, Kapadia BH, Khanuja HS, Mont MA. Osteonecrosis of the hip: treatment options and outcomes. *Orthop Clin.* 2013;44(4):463–76.
136. Ciombor DM, Aaron RK. Electric, electromagnetic, and acoustic treatment for avascular necrosis of the femoral head. *Tech Orthop.* 2008;23(1):11–7.
137. Massari L, Fini M, Cadossi R, Setti S, Traina GC. Biophysical stimulation with pulsed electromagnetic fields in osteonecrosis of the femoral head. *JBJS.* 2006;88(suppl_3):56–60.
138. Drescher W, Knobe M, Wagner W, Pufe T. New Therapies of Bone Necrosis. In: *Osteonecrosis.* Springer; 2014. p. 273–5.
139. Kuo TK, Ho JH, Lee OK. Mesenchymal stem cell therapy for nonmusculoskeletal diseases: emerging applications. *Cell Transplant.* 2009;18(9):1013–28.
140. Gangji V, De Maertelaer V, Hauzeur J-P. Autologous bone marrow cell implantation in the treatment of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head: five year follow-up of a prospective controlled study. *Bone.* 2011;49(5):1005–9.
141. Hernigou P, Beaujean F. Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Clin Orthop Relat Res.* 2002;405:14–23.
142. Learmonth ID, Maloon S, Dall G. Core decompression for early atraumatic osteonecrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Br.* 1990;72(3):387–90.

143. Mulliken BD. OSTEONECROSIS OF THE FEMORAL HEAD : CURRENT CONCEPTS AND CONTROVERSIES. :160–6.
144. Bs DRM, Seyler TM, Ulrich SD, Ba SS, Mont MA. Do Modern Techniques Improve Core Decompression Outcomes for Hip Osteonecrosis ? 2008;1093–103.
145. Dean MT, Cabanela ME. Transtrochanteric anterior rotational osteotomy for avascular necrosis of the femoral head. Long-term results. J Bone Joint Surg Br. 1993;75(4):597–601.
146. Stulberg BN, Zadzilka JD. Resurfacing Arthroplasty for Osteonecrosis of the Femoral Head. In: Osteonecrosis. Springer; 2014. p. 375–80.
147. O’Toole P, Parvizi J. Highly Crosslinked Polyethylene Liners in Patients with Osteonecrosis of the Femoral Head in the United States and Europe. In: Osteonecrosis. Springer; 2014. p. 349–53.
148. Wright JG. Revised grades of recommendation for summaries or reviews of orthopaedic surgical studies. JBJS. 2006;88(5):1161–2.
149. Jones LC, Tucci MA, Haile A, Wang D. Animal models of corticosteroid-associated bone diseases. In: Osteonecrosis. Springer; 2014. p. 493–505.
150. Bauer TW, McCarthy JJ, Stulberg BN. Osteonecrosis of the femoral head: Histologic diagnosis and findings after core biopsy. Osteonecrosis Etiol Diagnosis, Treat Rosemont, IL, Am Acad Orthop Surg. 1997;73–80.
151. Rowe SM, Chung JY, Moon ES, Jung ST, Lee HJ, Lee JJ. The effects of subluxation of the femoral head with avascular necrosis in growing rabbits. J Pediatr Orthop. 2004;24(6):645–50.
152. Li Y, Han R, Geng C, Wang Y, Wei L. A new osteonecrosis animal model of the femoral head induced by microwave heating and repaired with tissue engineered bone. Int Orthop. 2009;33(2):573–80.
153. Cruess RL, Ross D, Crawshaw E. The etiology of steroid-induced avascular necrosis of bone. A laboratory and clinical study. Clin Orthop Relat Res. 1975;(113):178–83.
154. Kawai K, Tamaki A, Hirohata K. Steroid-induced accumulation of lipid in the osteocytes of the rabbit femoral head. A histochemical and electron microscopic study. J Bone Joint Surg Am. 1985;67(5):755–63.
155. Warner JJP, PHILIP JH, BRODSKY GL, THORNHILL TS. Studies of Nontraumatic Osteonecrosis: Manometric and Histologic Studies of the Femoral Head After Chronic Steroid TreatmentAn

- Experimental Study in Rabbits. Clin Orthop Relat Res. 1987;225:128–40.
156. Bouteiller G, Arlet J, Blasco A, Vigoni F, Elefterion A. Is osteonecrosis of the femoral head avascular? Bone blood flow measurements after long-term treatment with corticosteroids. Metab Bone Dis Relat Res. 1983;4(5):313–8.
 157. Wang GJ, Hubbard SL, Reger SI, Miller ED, Stamp WG. Femoral head blood flow in long-term steroid therapy: study of rabbit model. South Med J. 1983;76(12):1530–2.
 158. Wang GJ, Dughman SS, Reger SI, Stamp WG. The effect of core decompression on femoral head blood flow in steroid-induced avascular necrosis of the femoral head. J Bone Joint Surg Am. 1985;67(1):121–4.
 159. Wang G-J, Lennox DW, Reger SI, Stamp WG, Hubbard SL. Cortisone-induced intrafemoral head pressure change and its response to a drilling decompression method. Clin Orthop Relat Res. 1981;(159):274–8.
 160. Drescher W, Li H, Lundgaard A, Bünger C, Hansen E-S. Endothelin-1-induced femoral head epiphyseal artery constriction is enhanced by long-term corticosteroid treatment. JBJS. 2006;88(suppl_3):173–9.
 161. Horwitz KB, Horwitz LD. Canine vascular tissues are targets for androgens, estrogens, progestins, and glucocorticoids. J Clin Invest. 1982;69(4):750–8.
 162. Sessa WC, Nasjletti A. Dexamethasone selectively attenuates prostanoid-induced vasoconstrictor responses in vitro. Circ Res. 1990;66(2):383–8.
 163. Wallerath T, Witte K, Schäfer SC, Schwarz PM, Prellwitz W, Wohlfart P, et al. Down-regulation of the expression of endothelial NO synthase is likely to contribute to glucocorticoid-mediated hypertension. Proc Natl Acad Sci. 1999;96(23):13357–62.
 164. Axelrod L. Inhibition of prostacyclin production mediates permissive effect of glucocorticoids on vascular tone: perturbations of this mechanism contribute to pathogenesis of Cushing's syndrome and Addison's disease. Lancet. 1983;321(8330):904–6.
 165. JAFFE WL, Epstein M, Heyman N, Mankin HJ. The Effect of Cortisone on Femoral and Humeral Heads in Rabbits An Experimental Study. Clin Orthop Relat Res. 1972;82:221–8.
 166. Fisher DE, Bickel WH, Holley KE, Ellefson RD. Corticosteroid-induced aseptic necrosis: II. Experimental study. Clin Orthop Relat Res. 1972;84:200–6.

167. Warner JJP, Philip JH, Brodsky GL, Thornhill TS. Studies of nontraumatic osteonecrosis. Manometric and histologic studies of the femoral head after chronic steroid treatment: an experimental study in rabbits. *Clin Orthop Relat Res.* 1987;(225):128–40.
168. Yamamoto T, Irisa T, Sugioka Y, Sueishi K, Yamamoto T, Irisa T, et al. Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues. Corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis Rheum Off J Am Coll Rheumatol*. 1997;40(11):2055–64.
169. Gold EW, Fox OD, Weissfeld S, Curtiss PH. Corticosteroid-induced avascular necrosis: an experimental study in rabbits. *Clin Orthop Relat Res.* 1978;(135):272–80.
170. Miyanishi K, Yamamoto T, Irisa T, Yamashita A, Jingushi S, Noguchi Y, et al. Bone marrow fat cell enlargement and a rise in intraosseous pressure in steroid-treated rabbits with osteonecrosis. *Bone.* 2002;30(1):185–90.
171. Sci O, Ichiseki T, Matsumoto T, Nishino M, Kaneuji A, Katsuda S. Oxidative stress and vascular permeability in steroid-induced osteonecrosis model. *J Orthop Sci.* 2004;9(5):509–15.
172. Jones LC, Allen MR. Animal models of osteonecrosis. *Clin Rev Bone Miner Metab.* 2011;9(1):63–80.
173. Jones Jr JP. Intravascular coagulation and osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res.* 1992;(277):41–53.
174. Zalavras CH. Potential aetiological factors concerning the development of osteonecrosis of the femoral head. *Eur J Clin Invest.* 2000;30(3):215–21.
175. Allardyce DB, Groves AC. Intravascular coagulation, hyperlipemia, and fat embolism: their association during the generalized Shwartzman phenomenon in rabbits. *Surgery.* 1969;66(1):71–5.
176. Brozna JP. Shwartzman reaction. In: *Seminars in thrombosis and hemostasis.* Copyright© 1990 by Thieme Medical Publishers, Inc.; 1990. p. 326–32.
177. Hirsch RL, McKay DG, Travers RI, Skraly RK. Hyperlipidemia, fatty liver, and bromsulfo-phthalein retention in rabbits injected intravenously with bacterial endotoxins. *J Lipid Res.* 1964;5(4):563–8.
178. Slofstra SH, Spek CA, ten Cate H. Disseminated intravascular coagulation. *Hematol J Off J Eur Haematol Assoc.* 2003;4(5):295–302.
179. Irisa T, Yamamoto T, Miyanishi K, Yamashita A, Iwamoto Y, Sugioka Y, et al. Osteonecrosis induced by a single administration of low-dose lipopolysaccharide in rabbits. *Bone.* 2001;28(6):641–

- 9.
180. Yamamoto T, Hirano K, Tsutsui H, Sugioka Y, Sueishi K. Corticosteroid enhances the experimental induction of osteonecrosis in rabbits with Shwartzman reaction. *Clin Orthop Relat Res.* 1995;(316):235–43.
 181. Guan X-Y, Han D. Role of hypercoagulability in steroid-induced femoral head necrosis in rabbits. *J Orthop Sci.* 2010;15(3):365–70.
 182. Masuhara M, Matsui M, Nakata K, Ono K. Animal models of osteonecrosis. In: *Animal models in orthopaedic research.* CRC Press; 1999. p. 261–78.
 183. Nakata K, Masuhara K, Nakamura N, Shibuya T, Sugano N, Matsui M, et al. Inducible osteonecrosis in a rabbit serum sickness model: deposition of immune complexes in bone marrow. *Bone.* 1996;18(6):609–15.
 184. Matsui M, Saito S, Ohzono K, Sugano N, Saito M, Takaoka K, et al. Experimental steroid-induced osteonecrosis in adult rabbits with hypersensitivity vasculitis. *Clin Orthop Relat Res.* 1992;(277):61–72.
 185. Jones Jr JP. Risk factors potentially activating intravascular coagulation and causing nontraumatic osteonecrosis. *Osteonecrosis Etiol diagnosis, Treat Rosemont, Am Acad Orthop Surg.* 1997;1997:89–97.
 186. Qin L, Zhang G, Sheng H, Yeung KW, Yeung HY, Chan CW, et al. Multiple bioimaging modalities in evaluation of an experimental osteonecrosis induced by a combination of lipopolysaccharide and methylprednisolone. *Bone.* 2006;39(4):863–71.
 187. Sheng H, Zhang G, Cheung W, Chan C, Wang Y, Lee K, et al. Elevated adipogenesis of marrow mesenchymal stem cells during early steroid-associated osteonecrosis development. *J Orthop Surg Res.* 2007;2(1):15.
 188. Wu X, Yang S, Duan D, Zhang Y, Wang J. Experimental osteonecrosis induced by a combination of low-dose lipopolysaccharide and high-dose methylprednisolone in rabbits. *Jt Bone Spine.* 2008;75(5):573–8.
 189. Song Q, Ni J, Jiang H, Shi Z. Sildenafil improves blood perfusion in steroid-induced avascular necrosis of femoral head in rabbits via a protein kinase G-dependent mechanism. *Acta Orthop Traumatol Turc.* 2017;51(5):398–403.

190. Elhwuegi AS. The Wonders of Phosphodiesterase-5 Inhibitors: A Majestic History. *Ann Med Health Sci Res.* 2016;6(3):139–45.
191. Corona G, Mondaini N, Ungar A, Razzoli E, Rossi A, Fusco F. Phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitors in erectile dysfunction: the proper drug for the proper patient. *J Sex Med.* 2011;8(12):3418–32.
192. Cesarini V, Guida E, Campolo F, Crescioli C, Di Baldassarre A, Pisano C, et al. Type 5 phosphodiesterase (PDE5) and the vascular tree: From embryogenesis to aging and disease. *Mech Ageing Dev.* 2020;190:111311.
193. Wright PJ. Comparison of phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitors. *Int J Clin Pract.* 2006;60(8):967–75.
194. Nichols DJ, Muirhead GJ, Harness JA. Pharmacokinetics of sildenafil citrate after single oral doses in healthy male subjects : absolute bioavailability , food effects and dose proportionality. 2002;5–12.
195. Fargue ST, Patterson BE, Bedding AW, Payne CD, Phillips DL, Wrishko RE, et al. Tadalafil pharmacokinetics in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2006;61(3):280–8.
196. Lu Z, Xu X, Hu X, Lee S, Traverse JH, Zhu G, et al. Oxidative stress regulates left ventricular PDE5 expression in the failing heart. *Circulation.* 2010;121(13):1474.
197. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci.* 1990;87(13):5193–7.
198. Hoke NN, Salloum FN, Kass DA, Das A, Kukreja RC. Preconditioning by phosphodiesterase-5 inhibition improves therapeutic efficacy of adipose-derived stem cells following myocardial infarction in mice. *Stem Cells.* 2012;30(2):326–35.
199. Vidavalur R, Penumathsa SV, Zhan L, Thirunavukkarasu M, Maulik N. Sildenafil induces angiogenic response in human coronary arteriolar endothelial cells through the expression of thioredoxin, hemeoxygenase and vascular endothelial growth factor. *Vascul Pharmacol.* 2006;45(2):91–5.
200. Narin F, Bilginer B, Isikay AI, Onal MB, Soylemezoglu F, Akalan N. The effect of phosphodiesterase inhibitor tadalafil on vasospasm following subarachnoid hemorrhage in an experimental rabbit model. In: *Early Brain Injury or Cerebral Vasospasm.* Springer; 2011. p. 13–6.

201. El-Sayed M-IK, Amin HA-KA. Mechanism of endothelial cyto-protective and thrombo-resistance effects of sildenafil, vardenafil and tadalafil in male rabbit. *Arch Med Sci AMS*. 2015;11(1):190.
202. Das A, Durrant D, Salloum FN, Xi L, Kukreja RC. PDE5 inhibitors as therapeutics for heart disease, diabetes and cancer. *Pharmacol Ther*. 2015;147:12–21.
203. Lledo-Garcia E, Subira-Rios D, Ogaya-Pinies G, Tejedor-Jorge A, Del Cañizo-Lopez JF, Hernandez-Fernandez C. Intravenous sildenafil as a preconditioning drug against hemodynamic consequences of warm ischemia-reperfusion on the kidney. *J Urol*. 2011;186(1):331–3.
204. Hart K, Baur D, Hodam J, Lesoon-Wood L, Parham M, Keith K, et al. Short-and long-term effects of sildenafil on skin flap survival in rats. *Laryngoscope*. 2006;116(4):522–8.
205. Shah A, Pfaff MJ, Assi R, Wu W, Steinbacher DM. PDE-5 inhibition improves skin flap viability in rats that are exposed to nicotine. *Microsurgery*. 2014;34(5):390–7.
206. Liu G, Sun X, Dai Y, Zheng F, Wang D, Huang Y, et al. Chronic administration of sildenafil modified the impaired VEGF system and improved the erectile function in rats with diabetic erectile dysfunction. *J Sex Med*. 2010;7(12):3868–78.
207. Huyut Z, Alp HH, Bakan N, Yıldırım S, Şekeroğlu MR. Stimulating effects of vardenafil, tadalafil, and udenafil on vascular endothelial growth factor, angiogenesis, vitamin D3, bone morphogenic proteins in ovariectomized rats. *Arch Physiol Biochem*. 2020;1–7.
208. Sahara M, Sata M, Morita T, Nakajima T, Hirata Y, Nagai R. A phosphodiesterase-5 inhibitor vardenafil enhances angiogenesis through a protein kinase G-dependent hypoxia-inducible factor-1/vascular endothelial growth factor pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(7):1315–24.
209. Maes C, Stockmans I, Moermans K, Van Looveren R, Smets N, Carmeliet P, et al. Soluble VEGF isoforms are essential for establishing epiphyseal vascularization and regulating chondrocyte development and survival. *J Clin Invest*. 2004;113(2):188–99.
210. Maes C, Carmeliet P, Moermans K, Stockmans I, Smets N, Collen D, et al. Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Mech Dev*. 2002;111(1–2):61–73.
211. Zelzer E, McLean W, Ng Y-S, Fukai N, Reginato AM, Lovejoy S, et al. Skeletal defects in VEGF120/120 mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Development*. 2002;129(8):1893–904.

212. Jacobsen KA, Al-Aql ZS, Wan C, Fitch JL, Stapleton SN, Mason ZD, et al. Bone formation during distraction osteogenesis is dependent on both VEGFR1 and VEGFR2 signaling. *J Bone Miner Res.* 2008;23(5):596–609.
213. Deckers MML, Van Bezooijen RL, Van Der Horst G, Hoogendam J, van Der Bent C, Papapoulos SE, et al. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology.* 2002;143(4):1545–53.
214. Wakabayashi S, Tsutsumimoto T, Kawasaki S, Kinoshita T, Horiuchi H, Takaoka K. Involvement of phosphodiesterase isozymes in osteoblastic differentiation. *J Bone Miner Res.* 2002;17(2):249–56.
215. Gong Y, Xu CY, Wang JR, Hu XH, Hong D, Ji X, et al. Inhibition of phosphodiesterase 5 reduces bone mass by suppression of canonical Wnt signaling. *Cell Death Dis.* 2014;5(11):e1544–e1544.
216. Alp HH, Huyut Z, Yildirim S, Başbugan Y, Ediz L, Şekeroğlu MR. The effect of PDE5 inhibitors on bone and oxidative damage in ovariectomy-induced osteoporosis. *Exp Biol Med.* 2017;242(10):1051–61.
217. Huyut Z, Bakan N, Yıldırım S, Alp HH. Effects of the phosphodiesterase-5 (PDE-5) inhibitors, avanafil and zaprinast, on bone remodeling and oxidative damage in a rat model of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Med Sci Monit Basic Res.* 2018;24:47.
218. Yaman F, Atilgan S, Günes N, Agacayak S, Günay A, Ucan MC, et al. Phosphodiesterase-5 inhibitors may facilitate bone defect recovery. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2011;15(11):1301–5.
219. Pal S, Rashid M, Singh SK, Porwal K, Singh P, Mohamed R, et al. Skeletal restoration by phosphodiesterase 5 inhibitors in osteopenic mice: evidence of osteoanabolic and osteoangiogenic effects of the drugs. *Bone.* 2020;135:115305.
220. Smith PK et al, Krohn R II, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano Md, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150(1):76–85.
221. Li J, Wang W. Positive effect of pentoxifylline on medication-related osteonecrosis of the jaw. *J Stomatol oral Maxillofac Surg.* 2020;121(3):264–7.
222. Owosho AA, Estilo CL, Huryn JM, Yom SK. Pentoxifylline and tocopherol in the management of cancer patients with medication-related osteonecrosis of the jaw: an observational retrospective study of initial case series. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2016;122(4):455–9.

223. Yalcin-Ulker GM, Cumbul A, Duygu-Capar G, Uslu Ü, Sencift K. Preventive effect of phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline against medication-related osteonecrosis of the jaw: an animal study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2017;75(11):2354–68.
224. Pessoa AL de C, de Oliveira Araújo VHV, Nascimento ALR, Elias N, de Carvalho JJ. Phosphodiesterase-5 inhibition improves bone regeneration at early stages of ischemic osteonecrosis of the femoral head in rats. *J Orthop Res.* 2020;
225. Conzemius MG, Brown TD, Zhang Y, Robinson RA. A new animal model of femoral head osteonecrosis: one that progresses to human-like mechanical failure. *J Orthop Res.* 2002;20(2):303–9.
226. Kawai A, Healey JH, Boland PJ, Athanasian EA, Jeon D-G. A rotating-hinge knee replacement for malignant tumors of the femur and tibia. *J Arthroplasty.* 1999;14(2):187–96.
227. Toğral G, Arıkan M, Korkusuz P, Hesar RH, Ekşioğlu MF. Positive effect of tadalafil, a phosphodiesterase-5 inhibitor, on fracture healing in rat femur. *Eklemler Hast Cerrahisi.* 2015;26(3):137–44.
228. Morelli A, Comeglio P, Filippi S, Sarchielli E, Vignozzi L, Maneschi E, et al. Mechanism of action of phosphodiesterase type 5 inhibition in metabolic syndrome-associated prostate alterations: An experimental study in the rabbit. *Prostate.* 2013;73(4):428–41.
229. Kabata T, Matsumoto T, Yagishita S, Wakayama T, Iseki S, Tomita K. Vascular endothelial growth factor in rabbits during development of corticosteroid-induced osteonecrosis: a controlled experiment. *J Rheumatol.* 2008;35(12):2383–90.