



Otoklavizasyon ve pastörizasyonun kemik iyileşmesi üzerine olumsuz etkisinin karşılaştırılması

Recep VURAL, Burak AKESAN, Mehmet KARAKAYALI, Ulviye YALÇINKAYA,* Ufuk AYDINLI

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, *Patoloji Anabilim Dalı

Amaç: Bu çalışmanın amacı otoklavizasyon ve pastörizasyonun kemik iyileşmesi üzerine olan etkisini karşılaştırmaktır.

Çalışma planı: Yetişkin 25 tavşan çalışmaya dahil edildi ve üç gruba ayrıldı. Grup 1’de, çıkarılan kemik bloklara otoklavizasyon uygulanırken grup 2’de pastörizasyon işlemi uygulandı. Grup 3’de ise kemik bloklara herhangi bir sterilizasyon işlemi uygulanmadı.

Sonuçlar: Heiple histolojik sınıflamasına göre, füzyon yüzeylerinin proksimal tarafındaki puanlar; grup 1’de 12.8 ± 0.4 , grup 2’de 6.8 ± 1.2 ve grup 3’de 10.2 ± 1.9 idi. Füzyon yüzeylerinin distal tarafındaki puanlar ise bu gruplarda sırasıyla, 10.8 ± 0.8 , 6.0 ± 1.1 ve 9.8 ± 1.5 idi. Üçüncü ve 6. haftada elde edilen radyografilere göre yapılan füzyon değerlendirmesinde gruplar arasında fark saptanmadı.

Çıkarımlar: Sonuç olarak, pastörizasyonun kemik iyileşmesi üzerine etkisi otoklavizasyon ile kıyaslandığında daha azdır ve uygun endikasyonlarda kemik sterilizasyonu için kullanılabilir.

Anahtar sözcükler: Kemik iyileşmesi; kemik sterilizasyonu; otoklavizasyon; pastörizasyon; tavşan.

Ortopedik onkolojide tümör rezeksiyonu sonrası uzuv kurtarıcı rekonstrüksiyon teknikleri popülerite kazanmıştır. Kemik transplantasyonlarında altın standart kabul edilen otolog kemik greftlerinin temini kısıtlı olduğundan tümör ile etkilenmiş kemik parçanın tekrar kullanılması ile ilgili bir kaç değişik teknik tanımlanmıştır. Bu teknikler pastörizasyon, otoklavizasyon ve radyasyonu içermekle birlikte bunlarla sınırlı değildir.^[1-2]

Çıkarılan kemiğin sterilizasyon işleminden sonar tekrar kullanılması, greftin şekil ve boyut uyumu, bu- laşıcı hastalık riskinin olmaması gibi avantajlara sahiptir.^[3,4] Bununla birlikte kemiğin otoklavizasyon ve radyasyon gibi yüksek ısılara maruz kalmasının kemik morfojenik protein ve diğer büyüme faktörlerini

negatif yönde etkilediği literatürde bildirilmiştir.^[2,5] Pastörizasyon ise 60° ile 65° sıcaklıklarda uygulanır ve kemik morfojenik protein üzerinde daha az etkiye sahip olduğuna inanılmaktadır.^[6,7]

Bu çalışmanın amacı otoklavizasyon ve pastörizasyonun kemik iyileşmesi üzerine olan etkilerini karşılaştırmaktır.

Gereç ve yöntem

Bu deneysel çalışma, Uludağ Üniversitesi Hayvan Bakım ve Kullanım Komitesi’nin onayı ile gerçekleştirilmiştir. Deney hayvanlarının acı çekmesini mümkün olduğunca azaltmak için tüm önlemler alınmıştır. Ortalama ağırlıkları 2400 gr (dağılım 2150-2750 gr) olan yetişkin erkek tavşanlar çalışma-

ya dahil edildi ve rastgele 3 gruba ayrıldı. Denekler standart kafeslerde su ve yiyecek ihtiyaçları karşılanarak muhafaza edildiler. Grup 1 ve grup 2’de 10 denek, grup 3’de (kontrol grubu) 5 denek çalışmaya dahil edildi.

Cerrahi işlemler

Deneklere kas içi ketamin hidroklorür (30-40 mgr/kg) ve ksilazin hidroklorür (3-5 mgr/kg) kullanılarak anestezi uygulandı.^[8] Her deneğe enfeksiyon profilaksisi (20 mgr/kg sefazolin sodium) uygulandı. Uygun arıtım ve örtümü takiben deneklerin sağ ulna kemiklerine ulaşıldı ve periost sıyrıldı. Kemik blok çıkartılmadan önce ulnaya 2 mm’lik K-teli intramedüller olarak yerleştirildi ve proksimale doğru çekildi. Yirmi milimetrelilik kemik blok termal hasarı azaltmak amacı ile el testeresi ile çıkartıldı. Tüm cerrahi işlemler tek cerrah (RV) tarafından uygulandı.

Birinci grupta çıkarılan kemik bloklar otoklavize (120°’de 20 dakika, oda ısısında 15 dakika, steril izotonik içinde 15 dakika) edildi. İkinci grupta çıkarılan kemik bloklar pastörize (60°’de steril izotonik içinde 30 dakika, oda ısısında 30 dakika, steril izotonik içinde 15 dakika) edildi.^[9,10] Üçüncü grupta çıkarılan kemik bloklara herhangi bir sterilizasyon işlemi uygulanmadı. Sterilizasyon işlemleri sonrası kemik bloklar çıkarıldıkları yerlere yerleştirilip K-teli ile sabitlendi. Tüm işlemler komplikasyon gelişmeden tamamlandı.

Ameliyat sonrası ağrı kontrolü 3 gün süre ile deneklerin sularına asetaminofen (1-2 mgr/mL) ekle-

nerek sağlandı.^[8] Ameliyat sonrası 3. ve 6. haftalarda sedasyon altında radyografiler çekildi. Radyografilerin çekilme amacı greftlerin pozisyonunu kontrol edip kaynama miktarını değerlendirme idi (Tablo 1). Bununla birlikte kaynamanın son değerlendirilmesi histolojik olarak yapıldı. Denekler ameliyat sonrası 6. haftada yüksek doz tiopental sodyum uygulanarak sakrifiye edildi. Sakrifikasyon sonrası deneklerin ulnaları en bloc çıkarıldı.

Histolojik değerlendirme

Çıkarılan kemik bloklar patoloji bölümünde 24 saat %10’luk formaldehit solüsyonu içerisinde tespit edildikten sonra 15 gün %10’luk formik asit içerisinde dekalsifiye edildi. Her bir kemik bloktaki osteotominin proksimal ve distal uçlarından kemiğin di-afizer aksına paralel seri kesitler (4 µm kalınlığında) alındı. Doku kesitleri silinathı slaytlara yerleştirildi ve 37 °C’de kurumaya bırakıldı. Kesitler daha sonra hematoksilin-eozin (H-E) ile boyandı.

Distal ve proksimal kaynama yüzeylerindeki doku morfolojisi ve iyileşme skorlaması Heiple ve ark.^[11] tanımladığı kriterlere göre yapıldı (Tablo 1). Kaynama ve kemik iyileşme kalitesi 5 ayrı altgrupta, maksimum toplam 13 puan üzerinden değerlendirildi. Radyolojik değerlendirme 3. ve 6. haftalarda çekilen radyografiler ile Lane^[12] tarafından tanımlanan kriterlere göre yapıldı (Tablo 2).

İstatiksel analizlerde Mann-Whitney testi kullanıldı (Windows için SPSS 16.0). İstatistiksel anlamlılık sınırı p<0.05 olarak kabul edildi.

Tablo 1

Heiple’in^[11] sayısal histolojik değerlendirmesi

Skor	0	1	2	3	4	5
Allogreftin görünümü	Hücreselel aktivite yok	Hücreselel aktivite var	Tam birleşme	-	-	-
Kemik uçların devamlılığı	Hayır	Evet				
Kallus dokusu	Yok	Fibröz	Kıkırdak	Kemik	-	-
Kemik uçlar	Nekrotik	Rezorbe	Yeni kemik yakınlaşması	-	-	-
Yeni kemik dokusunun kalitesi	-	Başlangıç	Tek odaklı gevrek kemik	Trabeküller gevrek kemik	Köprüleşen trabeküller	lamellar kemik

Tablo 2	
Ameliyat sonrası 6. haftada radyolojik skorlama	
0	Erken postoperatif dönemden fark yok
1	Dansitede hafif artış
2	Köprüleşen tek korteks, görülebilen dansite artışı
3	Tek korteks köprüleşmesi, greftin erken dönem inkorporasyonu
4	Medial ve lateral kenarlarda köprüleşme, yeni kemik greftten kolayca ayrılmıyor
5	En azından 4 kortekste yeni kemik oluşumu
6	Yeni kemik oluşumu, greft görüntüsü yok, korteks uçları ayrıt edilmiyor

Sonuçlar

Histolojik değerlendirme

Proksimal kaynama yüzeylerindeki Heiple skorları grup 1, grup 2 ve grup 3 için sırasıyla 12.8 (ortanca 13, dağılım 12-13), 6.8 (ortanca 10, dağılım 8-13), 10.2 (ortanca 6.5, dağılım 5-9) idi. Gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık yoktu ($p < 0.05$). Distal kaynama yüzeylerindeki Heiple skorları gruplar için sırasıyla 10.8 (ortanca 11, dağılım 10-12), 6.0 (ortanca 9.5, dağılım 8-13), grup 3: 9.8 (ortanca 6, dağılım 4-8) idi. Tüm grupların birbirleri ile karşılaştırılmasında $p < 0.05$ idi (Tablo 3).

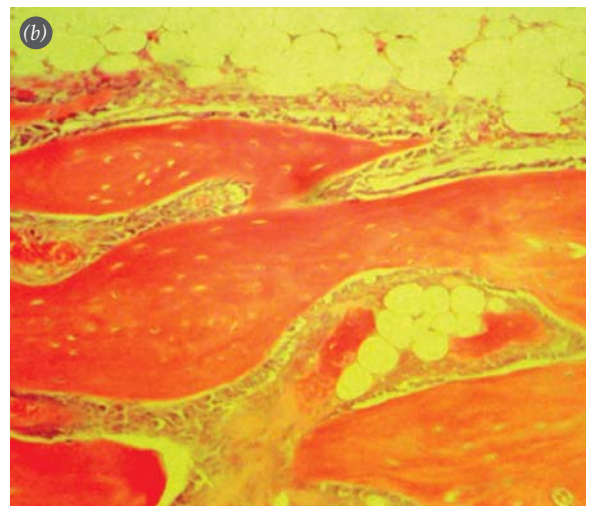
Üçüncü haftada yapılan radyolojik değerlendirmede proksimal kaynama yüzeylerindeki skorlar sırasıyla 4 (ortanca 3, dağılım 2-4), 3 (ortanca 4, dağılım 1-4) ve 3.2 (ortanca 4, dağılım 2-6) idi. Distal kaynama yüzeylerindeki skorlar ise sırasıyla 3.6 (ortanca 3, dağılım 2-4), 3 (ortanca 3.5, dağılım 1-6) ve 3.2 (or-

tanca 4, dağılım 2-4) idi. Altıncı hafta yapılan radyolojik değerlendirmede proksimal kaynama yüzeylerindeki skorlar gruplar için sırasıyla 5.4 (ortanca 5, dağılım 4-6), 5 (ortanca 6, dağılım 4-6) ve 5.4 (ortanca 6, dağılım 4-6) idi. Distal kaynama yüzeylerindeki skorlar ise sırasıyla 5.2 (ortanca 4, dağılım 4-6), 4.5 (ortanca 5.5, dağılım 3-6) ve 5.1 (ortanca 6, dağılım 4-6) idi. Radyolojik değerlendirme skorlarında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p > 0.05$) (Şekil 1-3).

Tartışma

Ortopedik onkolojide tümör kitlesinin rezeksiyonundan sonra oluşan boşlukların yeniden yapılandırılması için değişik teknikler tanımlanmıştır. Bu boşlukların doldurulmasında artroplastisi ve diğer prostetik implantlar ilk tercih olup bunların biomekanik avantajları bilinmektedir. Bununla birlikte, aşınma partikülleri, implant yetmezliği ve gevşeme-

Şekil 1. (a) Kontrol grubundaki tavşanın ameliyat sonrası 6. haftada çekilen radyografisi. (b) Distal kaynama yüzeyinin histolojik görünümünde osteoblastik kenarları bulunan kemik trabekülleri görülmektedir (H-E x200).



Tablo 3

Çalışma gruplarının radyolojik ve histolojik skorları

	Proksimal (histolojik)	Distal (histolojik)	Proksimal (radyolojik)		Distal (radyolojik)	
			3 hafta	6 hafta	3 hafta	6 hafta
Kontrol grubu (Grup 1)						
1	13	10	2	6	4	4
2	13	11	4	5	4	6
3	13	10	6	6	4	6
4	13	12	4	6	4	4
5	13	11	4	4	2	6
Ortalama skor	12.8	10.8	4	5.4	3.6	5.2
Otoklavizasyon grubu (Grup 2)						
1	6	6	2	4	2	4
2	7	5	4	6	3	5
3	6	6	2	4	3	5
4	9	6	4	6	3	4
5	6	6	2	5	3	4
6	8	5	2	4	4	5
7	6	8	4	4	3	4
8	5	4	2	5	4	6
9	7	7	4	6	2	4
10	8	7	4	6	3	4
Ortalama skor	6.8	6.0	3.0	5.0	3.0	4.5
Pastörizasyon grubu (Grup 3)						
1	8	8	2	5	2	5
2	12	10	4	6	6	6
3	9	8	2	4	1	3
4	12	9	4	6	4	6
5	11	11	4	6	3	6
6	9	9	1	6	4	4
7	13	13	3	6	4	6
8	12	10	4	6	4	5
9	8	11	4	4	3	6
10	8	9	4	5	2	4
Ortalama skor	10.2	9.8	3.2	5.4	3.2	5.1

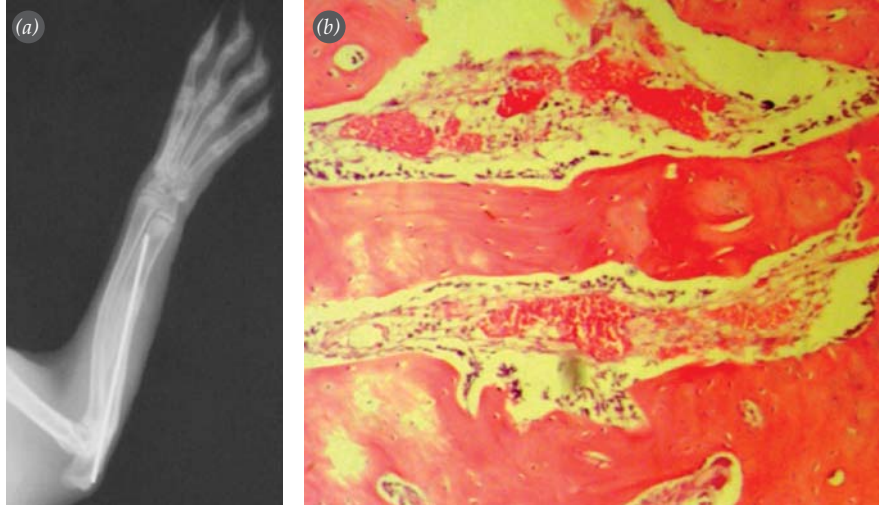
si günümüzde sorun olmaya devam etmektedir. Bu sorunların varlığı araştırmacıları biyolojik çözümler bulmaya itmiştir. Ayrıca, protez cerrahisine bağlı mortalite ve morbidite riskleri nedeni ile daha az girişimsel tekniklerin önemi artmıştır.^[13-16]

Çıkarılan kemik dokusunun yerine allograft konulması da sıklıkla uygulanan bir tekniktir. Ancak,

immünolojik tepkiler, hastalık yayılması, kaynama riski ve kemik bankasına ihtiyaç duyulması bu tekniğin önemli eksiklerindedir.

Tümör hücrelerinin öldürülmesinden sonra çıkarılan kemik dokunun tekrar kullanılması fikri popülarite kazanmıştır. Bu yaklaşımla küratif tedavinin mümkün olmasına ek olarak protez ve diğer implant-

Şekil 2. (a) Otoklavizasyon uygulanan gruptaki (grup 1) tavşanın ameliyat sonrası 6. haftada çekilen radyografisi. (b) Ulnar kemik kaynama yüzeyinin distal bölümünün histolojik görünümünde kemik trabeküllerinin anastomozu görülmektedir (H-E x200).



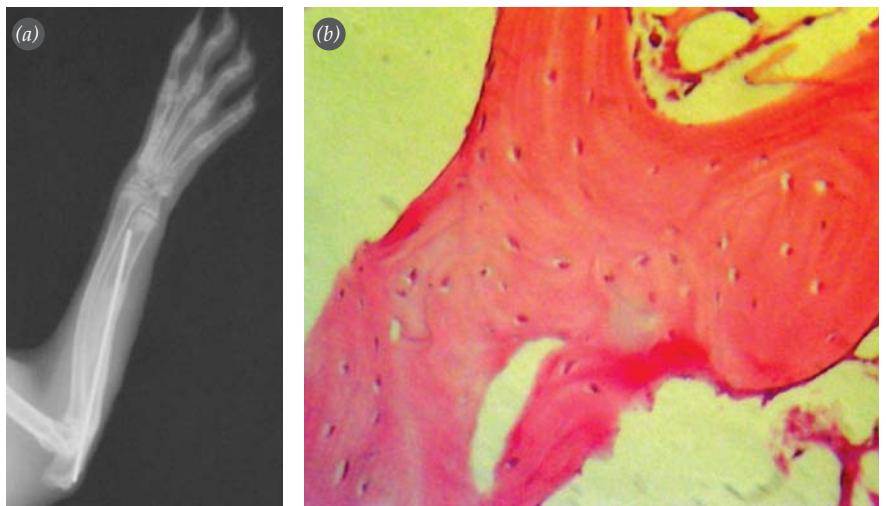
ların potansiyel risklerinden de korunmuş olunur. Bu teknikte en önemli nokta çıkarılan tümörle etkilenmiş kemik dokusunun otogreft olarak kullanılmadan önce tümör hücrelerinden arındırılmasıdır. Bunun için en sık kullanılan yöntemlerden ikisi pastörizasyon ve otoklavizasyondur.^[1,2,15]

Diğer taraftan, bu tekniklerle ilgili en önemli endişe tekrar kullanılacak kemik dokusunun biyolojik mekanik özelliklerini yitirmesidir. Kohler ve ark.^[17] biyomekanik çalışmalarında otoklavizasyonun tavşan kemiğinin kütleini ve direncini kötü yönde etkilediğini bildirmişlerdir. Bunun nedeni olarak kollajen denatürasyonu ve 70° üzeri sıcaklıkta kollajenin jelatin solüsyonuna dönüşmesini göstermişlerdir.

Pastörizasyonun, otoklavizasyon ile kıyaslandığında osteoindüksiyondan sorumlu büyüme faktörleri üzerinde etkisi olmadığı düşünülmektedir.^[2] Ehara ve ark.^[5] pastörize otogreft kullandıkları çalışmalarında 8 hastanın 5'inde tam radyolojik kaynama olduğunu bildirmişlerdir.

Zoricic ve ark.^[2] çalışmalarında pastörize, otoklavize ve donmuş allgreftlerin biyolojik kalitelerini karşılaştırmışlardır. Çalışmalarında pastörizasyon sırasında kullanılan sıcaklığın allgrefti tutan HIV virüsünü kemiğin osteojenik özelliklerini etkilemeden temizlemek için yeterli olduğunu savunmuşlardır. Ancak, bu çalışmada çıkarılan kemikler tekrar kullanılmamış, bunun yerine allgreft olarak kullanılmış-

Şekil 3. (a) Pastörizasyon uygulanan gruptaki (grup 2) tavşanın ameliyat sonrası 6. haftada çekilen radyografisi. (b) Ulnar kemik kaynama yüzeyinin distal bölümünün histolojik görünümünde olgun kemik dokusu izlenmektedir (H-E x200).



tır. Çalışmamızda gerçek cerrahi senaryoya yakın olmak amacı ile çıkarılan kemik parçalar sterilizasyon sonrası eski yerlerine yerleştirilmiştir.

Bir hayvan deneyinde Manabe ve ark.^[6] pastörize, otoklavize, kaynatılmış ve taze kemiklerin biyomekanik dirençlerini ve osteokondüktivitesini karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada otoklavize edilen kemiklerin kemik içeriğinde dejenerasyon geliştiği ve greftlerin çok az yeni kemik oluşumu ve yetersiz kaynama ile emildiği sonucuna varılmıştır. Buna karşın pastörize edilen greftlerin korunduğu ve yerlerine sağlıklı yeni kemik dokusunun aldığı bildirilmiştir.

Bu çalışmada otoklavizasyonun uygulandığı grupta distal kaynama yüzeyinde iki kaynamama ve greft emilimi gözlenmiştir. Bunun neden distal yüzeyde olduğunu malesef bilimsel olarak açıklayamamaktayız. Altıncı haftanın sonunda radyolojik ve histolojik sonuçlar benzer olmakla beraber, kaynama oranları histolojik olarak pastörizasyon uygulanan grupta daha yüksekti.

Sonuç olarak, otoklavizasyon ile karşılaştırıldığında pastörizasyonun kemik iyileşmesi üzerindeki negatif etkisi daha azdır ve uygun endikasyonlarda bu yöntem kullanılabilir.

Kaynaklar

- Araki N, Myoui A, Kuratsu S, Hashimoto N, Inoue T, Kudawara I, et al. Intraoperative extracorporeal autogenous irradiated bone grafts in tumor surgery. *Clin Orthop Relat Res* 1999;(368):196-206.
- Zoricic S, Bobinac D, Lah B, Maric I, Cvijanovic O, Bajek S, et al. Study of the healing process after transplantation of pasteurized bone grafts in rabbits. *Acta Med Okayama* 2002;56:121-8.
- Kim HS, Kim KJ, Han I, Oh JH, Lee SH. The use of pasteurized autologous grafts for periacetabular reconstruction. *Clin Orthop Relat Res* 2007;464:217-23.
- Uyttendaele D, De Schryver A, Claessens H, Roels H, Berkvens P, Mondelaers W. Limb conservation in primary bone tumours by resection, extracorporeal irradiation and re-implantation. *J Bone Joint Surg Br* 1988;70:348-53.
- Ehara S, Nishida J, Shiraishi H, Tamakawa Y. Pasteurized intercalary autogenous bone graft: radiographic and scintigraphic features. *Skeletal Radiol* 2000;29:335-9.
- Manabe J. Experimental studies on pasteurized autogenous bone graft. [Article in Japanese] *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 1993;67:255-66.
- Izawa H, Hachiya Y, Kawai T, Muramatsu K, Narita Y, Ban N, et al. The effect of heat-treated human bone morphogenetic protein on clinical implantation. *Clin Orthop Relat Res* 2001;(390):252-8.
- Hrapkiewicz K, Medina L, Holmes DD. *Clinical medicine of small mammals and primates: an introduction*. 2nd ed. London: Manson Publishing; 1998. p. 135-72.
- Köhler P, Kreicbergs A. Incorporation of autoclaved autogenous bone supplemented with allogenic demineralized bone matrix. An experimental study in the rabbit. *Clin Orthop Relat Res* 1987;(218):247-58.
- Ahmed AR, Manabe J, Kawaguchi N, Matsumoto S, Matsushita Y. Radiographic analysis of pasteurized autologous bone graft. *Skeletal Radiol* 2003;32:454-61.
- Heiple KG, Chase SW, Herndon CH. A comparative study of the healing process following different types of bone transplantation. *J Bone Joint Surg Am* 1963;45:1593-616.
- Lane JM, Sandhu HS. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am* 1987;18:213-25.
- Harris IE, Leff AR, Gitelis S, Simon MA. Function after amputation, arthrodesis, or arthroplasty for tumors about the knee. *J Bone Joint Surg Am* 1990;72:1477-85.
- Gitelis S, Piasecki P. Allograft prosthetic composite arthroplasty for osteosarcoma and other aggressive bone tumors. *Clin Orthop Relat Res* 1991;(270):197-201.
- Cannon SR. Massive prostheses for malignant bone tumours of the limbs. *J Bone Joint Surg Br* 1997;79:497-506.
- Böhm P, Fritz J, Thiede S, Budach W. Reimplantation of extracorporeal irradiated bone segments in musculoskeletal tumor surgery: clinical experience in eight patients and review of the literature. *Langenbecks Arch Surg* 2003;387:355-65.
- Köhler P, Kreicbergs A, Strömberg L. Physical properties of autoclaved bone. Torsion test of rabbit diaphyseal bone. *Acta Orthop Scand* 1986;57:141-5.