



# Deneysel osteomyelit modellerine güncel yaklaşım

## Current approach to experimental osteomyelitis models

Fehmi Volkan Öztuna<sup>1,2</sup>, Ender Gümüšoğlu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Mersin

<sup>2</sup>VM Medical Park Mersin Hastanesi, Mersin

Tedavi hedeflerini belirlemek, yeni aşılı ve antimikrobiyal ajanları test etmek, biyofilm oluşması ve kemik yıkımı gibi sorunlu faktörleri tanımlamak için çok sayıda deneysel osteomyelit modeli geliştirilmiştir. Tarihsel olarak, osteomyelitin hayvan modelleri; radyografi, histoloji, klinik skorlama sistemleri ve patojen yükünün yarı kantitatif ölçümleri gibi ölçümlere dayanmaktadır. Bu yazıda nicel bakteriyolojik ve görüntüleme araçlarına, biyofilm oluşmasının modellenmesine ve lokal antimikrobiyal uygulama stratejilerine odaklanarak osteomyelitin in vivo ve in vitro deney modellerinde yeni gelişmeleri gözden geçirdik.

**Anahtar sözcükler:** deneysel; osteomyelit; in vivo, in vitro

Numerous experimental osteomyelitis models have been developed to set therapeutic targets, test new vaccines and antimicrobial compounds, and identify factors limiting model therapy such as biofilm formation and bone destruction. Historically, animal models of osteomyelitis; based on assisted pathogenesis measurements such as radiography, histology, clinical scoring systems, and semi-quantitative measurements of pathogen burden. We highlight new developments in experimental models of osteomyelitis, with a focus on quantitative bacteriologic and imaging tools, modeling of biofilm growth and strategies for local antimicrobial delivery.

**Key words:** experimental; osteomyelitis; in vivo, in vitro

Osteomyelitin gelişim sürecinde, kişinin bağışıklık sistemi ve mikroorganizmanın virülansı ile ilgili birçok faktör rol oynadığı için henüz osteomyelitin patogenezi konusunda fikir birliğine varılamamıştır. İnsanlarda, hastalığın ne zaman başladığını bilme ve kişisel değişkenlere müdahale etme şansı olmadığı için kontrollü klinik çalışmalar yapmak olası değildir. Bu nedenle tedavi amaçlı yaklaşımları, iyi tanımlanmış hayvan modellerini kullanarak deneysel ortamlara taşımak gerekir. Hayvan deneylerinin, antibiyotiklerin kemik dokudaki seviyesini ya da serum bakterisidal seviyesini monitörize edebilme gibi avantajları da vardır. Bu durumda hayvan deneyleri, osteomyelit patogenezi ve tedavisinin incelenbildiği en güvenilir yöntemler olarak karşımıza çıkmaktadır.

Antibiyotiklerin, enfeksiyonları tedavi etmekte yetersiz kaldığı bu günlerde, *S.aureus* enfeksiyonlarının en etkili tedavisi kuşkusuz bir şekilde aşılama ile bağışıklık kazandırmaktır. Fakat günümüzde yapılan aşı çalışmalarının (V710) geldiği son noktada, istenmeyen ölümler dahil olmak üzere ciddi komplikasyonlar

görülmektedir ve henüz bir başarı elde edilememiştir. Bu nedenle halen osteomyelit tedavisinde yeni tasarımlar belirlemek, yeni aşılı ve antimikrobiyal ajanları test etmek, biyofilm oluşumu ve kemik yıkımı gibi sorunları tanımlamak için çok sayıda deneysel (in vitro ve in vivo) osteomyelit modeli geliştirilmektedir.

### İN VİTRO OSTEOMİYELİT MODELLERİ

Enfeksiyon sürecinde osteomyelitin erken (klinik olarak belirgin olmayan) evrelerinin incelenmesi zordur ve hatta mümkün değildir. Bu nedenle, erken hastalık aşamalarında osteomyelitin insan kemik iliği ve hematopoez üzerindeki etkisini araştırmak için in vitro model sistemlerine ihtiyaç vardır. Ayrıca, hayvan modellerinin kısıtlamaları vardır: i) Osteomyelitin ana nedeni biyofilm olmasına rağmen, halen birçok deneysel modelde intramedüller alana bakteri inokülasyonu yapılmaktadır; ii) hayvan modellerinde osteomyelit gelişme oranları tutarsızdır (%47-100) ve iii) enfekte hayvanların ölüm oranı yüksektir<sup>[1,2]</sup>; iv) günümüze kadar yapılan in vitro çalışmalar, insan

hücrelerinin bakteriyel membran bileşenlerine, salınan bakteriyel faktörlere veya bakterilere yanıtının araştırıldığı geleneksel iki boyutlu hücre kültürleriyle sınırlandırılmıştır.<sup>[3-8]</sup> Bir yenilik olarak Raic ve ark., ameliyat sonrası osteomyeliti taklit etmek için biyomimetik kemik/kemik iliği analoğu, kontamine implanttan biyofilm üretebilecek üç boyutlu modeli ve hem bakteriler hem de ökaryot hücreler için gereken uygun büyüme koşullarını ortaya koymuşlardır. Bunu yaparken geleneksel sığır albüminini katyonize ederek oluşturdukları katyonize domuz albümini (cBSA), hücre adhezyon materyal iskelesi olarak kullanmışlardır. Bu modelde osteomyelite verilen yanıt anlamında hematopoezi incelemenin fonksiyonel ve uygun olduğunu bildirmişlerdir.<sup>[9]</sup>

Tuscherr ve ark., in vivo ve in vitro osteomyelit modellerinde *S.aureus*'un, kronik osteomyelit sırasında dinamik küçük koloni varyantları oluşturarak antibiyotiklere karşı artan direnç geliştirdiklerini göstermişlerdir. Bu çalışmada in vitro model, hücre kültürlerinde insan osteoblastlarını *S.aureus* ile enfekte edilerek yapılmıştır.<sup>[10]</sup>

Junka ve ark., in vivo ve eks vivo ortamda oluşturulan biyofilmin konak immunitesi ve osteoklastogenezisten bağımsız olarak kemik destrüksiyonu yaptığını gösterdikleri çalışmada *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *C.albicans* ve *S.mutans* patojenlerini kullanmışlardır. Hidroksiapatit ve rat mandibulası kullanılarak yürütülen bu çalışmada biyofilm tabakasının kemiğe olan direkt etkileri mikro bilgisayarlı tomografi ile ortaya koyulmuştur. İn vitro ortamda üretilen biyofilm tabakası ise önce inkübasyon ardından kantitatif kültürler hazırlanmış olup elektron mikroskopisi ile doğrulanmıştır.<sup>[11]</sup>

## İN VİVO MODELLER

Bilinen en eski deneysel osteomyelit modeli ise 1884'de Rodet tarafından tavşanlarda yapılmış ve *S.aureus*'un i.v. olarak verilmesi sonrası kemikte abselerin oluştuğu gözlenmiştir.<sup>[12]</sup>

Günümüzde küçük hayvanlar, osteomyelit araştırmalarında başarı ile kullanılmaktadır; ancak birden fazla prosedürün yapılamaması ve büyük hayvanlar için kullanılan implantların kullanılamaması dezavantajlardır.

Deneysel osteomyelit modellerine basit bir sınıflama yapılacak olursa:

- a) Akut,
- b) Kronik;
  - İmplantsız enfeksiyonlar
  - İmplant ilişkili enfeksiyonlar

olarak sınıflandırılabilirliğini görmekteyiz.

Deney hayvanlarında sadece kemik absesi değil ilerleyici karakterde osteomyelit oluşturmak için lokal kemik hasarı yapmak şarttır.<sup>[12]</sup> Bunun için kimyasal ve fiziksel yöntemler kullanılmıştır. En sık kullanılan yöntem, kemiğin metafizer bölgesinde bir delik açıp medüller kanala sklerozan madde enjekte etmektir.<sup>[13-16]</sup> Lokal hasar oluşturduktan sonra bakterinin verilmesi konusunda farklı uygulamalar vardır:

1. Bakterinin sistemik (i.v.) verilmesi
2. Bakterinin lokal verilmesi

Ayrıca ortamda bir yabancı cisim ya da implant varlığı durumunda gelişen osteomyelitlerin deneysel modelleri için implant/yabancı cisim ilişkili modeller tanımlanmıştır. Bu modeller iki şekilde sınıflandırılabilir:

- a) Önceden kolonize edilmiş implant/yabancı cisim konan modeller<sup>[17]</sup>
- b) Steril implant/yabancı cisim konan modeller<sup>[18]</sup>

Bu tekniklerin birçok modifikasyonu olmakla birlikte en sık kullanılan temel modeller Tablo 1'de verilmiştir.

Bu güne kadar osteomyelitinin patogenezi hakkındaki bilgilerin çoğu tavşan, sıçan, fare, kobay, tavuk, köpek, koyun ve keçi üzerinde yapılan çalışmalardan elde edilmiş ve geliştirilen tedavi yaklaşımları bu modeller

**Tablo 1.** Temel osteomyelit hayvan modelleri

Denek	Yazarlar	Teknik
Tavşan	Norden ve Kennedy <sup>[13]</sup>	Tibiaya intramedüller %5'lik sodyum moruat enjeksiyonunu takiben 10 <sup>8</sup> CFU <i>S.aureus</i> verilmesi. Bu model önce Scheman ve ark. tarafından 1941'de tanımlanmıştır.
Sıçan	Zak ve ark. <sup>[15]</sup>	Tibiaya intramedüller Na moruat enjeksiyonunu takiben 10 <sup>5-6</sup> CFU <i>S.aureus</i> verilmesi ve bonevaks ile deliğin kapatılması.
Köpek	Fitzgerald <sup>[19]</sup>	Tibia metafizinde 1×1 defekt yapıp 10 <sup>9</sup> CFU <i>S.aureus</i> verilmesi ve sement ile defektin kapatılması.

üzerinde denenmiştir.<sup>[20]</sup> Osteomyelit deneylerinin değerlendirilmesi, radyografi, histoloji, klinik skorlama sistemleri ve patojen yükünün yarı kantitatif ölçümleri gibi ölçümlere dayanmaktadır.

## MODELLERDEKİ YENİLİKLER

Klasik deneysel modellerde çalışma süresi sonunda enfekte kemik ve implant tamamen çıkartılıp gerekli histolojik, mikrobiyolojik değerlendirmeler yapılır ve o denekler çalışmadan çıkartılır. Eğer çalışma daha uzun bir takip dönemi gerekiyorsa farklı bir grup oluşturulup farklı zaman dilimlerine doğru çalışma uzatılır. Brinkman ve ark., *S.aures* ve *S.epidermidis* ile biyofilm oluşturdukları üç adet enfekte K-telini, aynı sıçanın ti-biasına yerleştirmişlerdir. İşlemden sonra 4., 5., ve 6. haftalarda telleri teker teker çekerek aynı denekte farklı zaman dilimlerinde enfeksiyonu monitörize etme fırsatı yakalamışlardır. Rifampisin tedavisinin etkinliğini aynı denekte farklı zaman dilimlerinde gözleme fırsatı oluşturmuşlardır.<sup>[21]</sup>

Büren ve ark., kırık ilişkili enfeksiyonları inceleyen deneysel çalışmalarda kullanılan histolojik sınıflamanın daha kapsamlı olması gerektiğini savunarak yeni bir sınıflama modeli geliştirmişlerdir. Farelerde yaptıkları *S.aureus* osteomyelit modelinde (femur osteotomi ve plak-vida tespiti zemininde) normal parametreler yanında 1) kallus-korteks oranı, 2) kaynamanın miktarı, 3) kemik iliği değişiklikleri ve 4) bakteri sayısı (100 bütmede 20 sahada dört ve üzeri bakteri varlığı) kriterlerini eklemişlerdir.<sup>[22]</sup>

Bottagisio ve ark., tavşan osteomyelit modellerini inceledikleri derlemelerinde 2008 ile 2018 arası çıkan yayınları incelemişlerdir. Toplam 708 çalışmanın sadece 115 tanesini değerlendirmeye uygun bulmuşlardır. Tavşan modelinin fare ve sıçan modelleri kadar değerli çalışmalar olduğunu, kemik dansitometresi açısından insana en yakın model olduğu, deneylerde halen %35 oranda tavşan modeli kullanıldığını, en çok tibia, femur ve radiusun kullanıldığını, implant ilişkili kırık modellerinde plak-vida modelinin tercih edildiğini (İM çividen daha çok) saptamışlardır. Ama tavşanların anestezi ajanlarına ve antibiyotiklere olan hassasiyeti sıçanlara kıyasla daha fazla olduğunu belirtmişlerdir.<sup>[23]</sup>

## OSTEOMİYELİT PATOGENEZİNİN KANTİTATİF ÖLÇÜLERİ VE BİYOLÜMINESANS TEKNİĞİ

Yeni aşuların ve antimikrobiyal bileşiklerin; osteomyelit tedavisindeki etkinliğini doğru bir şekilde değerlendirmek için, enfekte kemik örneklerinde bakteriyel yüklerin nicel olarak ölçülmesine yönelik yöntemlerin geliştirilmesi çok önemlidir. Bakterilerin kemikten izolasyonu zordur, ancak deneysel osteomyelit

modellerindeki son yenilikler hem dolaylı hem de doğrudan önlemler kullanarak bakteriyel yüklerin kesin olarak ölçülmesine izin vermiştir. Hayvan görüntüleme teknolojilerindeki ilerlemeler, enfeksiyon seyri sırasında bakteriyel çoğalmanın kantitatif tayinlerine izin verir. Biyoluminisans görüntüleme, osteomyelite maruz kalan canlı hayvanlarda patojen yükünü izlemek için başarıyla kullanılmıştır.<sup>[20,24-26]</sup> Lüminesan sinyal, enfeksiyondan sonra birkaç ay boyunca stabil olarak ölçülebildiğinden, bu invaziv olmayan teknikler deneysel terapötiklerin in vivo etkinliğinin uzun dönem ölçülebilirliği için uygundur. Moleküler görüntüleme, canlı deneklerde moleküler biyolojinin ve hücre biyolojisinin invaziv olmayan görüntülenmesine ve ölçülmesine izin verir. Esas olarak biyoluminisans ve floresan tekniklerini kullanarak yapılan moleküler görüntüleme; osteoblastlar, osteoklastlar ve hormonların aktivitesi, patolojik kırık ve kemik yıkımı mekanizmaları, osteoliz ve osteomyelite hücresel süreçleri gösterebilir.<sup>[27]</sup>

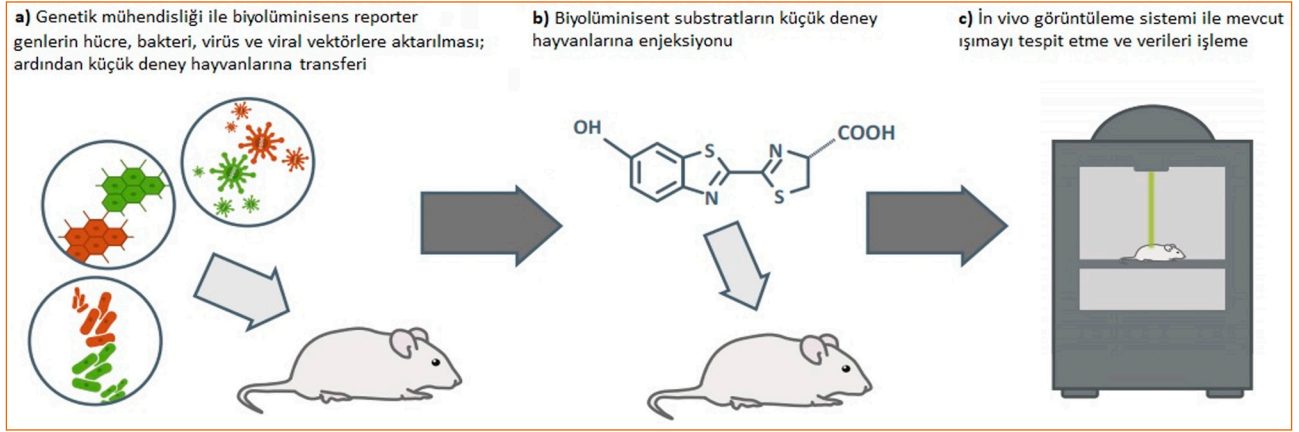
Biyoluminisans ışımaya, mikroorganizmalar da dahil olmak üzere çeşitli organizmalar tarafından iletişim, üreme ve savunma gibi amaçlar için kullanılır ve hücrelerden görünür ışığın enzimatik üretimi olarak tanımlanır. Fotoaktif proteinlerin biyoloji ve tıpta kullanımı yeşil floresan proteininin *E.coli* DNA'sına plazmit aracılığı ile transfer edilmesi ile başlamıştır. Bu araştırma ile 2008 yılında Chalfie, Shimomura ve Tsien Nobel Kimya ödülünü kazanmışlardır.<sup>[28]</sup>

In vivo biyoluminisans görüntüleme, lusiferaz enzimleri ve substratları tarafından üretilen biyoluminisansın görsel temsilini sağlar. Lusiferaz enzimini ekspres eden genetiği değiştirilmiş hücreler veya hayvanlarda biyoluminisans ışımaya; enzimin substratı olan lusiferin enjekte edildikten sonra ışımaya yapan fotonları elektron yüklerine çeviren hassas kameralar kullanılarak görüntülenebilir (Şekil 1).<sup>[29]</sup>

Ortopedi ve travmatoloji de özellikle osteomyelit için terapötik müdahaleleri gerçek zamanlı olarak izlemek amaçlı biyoluminisans görüntüleme tekniği kullanılarak uygun in vivo osteomyelit modellerinin (ve diğer birçok bakteriyel enfeksiyonun) geliştirilmesi için çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda genellikle *S. Aureus* bakteri kromozomu üzerinde *Photobacterium luminescens lux operon*'un stabil bir kopyasına sahip suşlar kullanılmıştır (*S.aureus* –*Xen29*).<sup>[24,30]</sup>

## OSTEOMİYELİTTE GÖRÜNTÜLEME TEKNİKLERİ

Enfekte kemikteki patojen yüklerinin miktarının ölçülmesine ek olarak, şimdi osteomyelit hayvan modellerinde patojene bağlı kemik yıkımının görüntülenmesi de mümkündür. Mikrobilgisayarlı tomografi



**Şekil 1.** İn vivo biyoluminisans görüntülemenin şematik yolla anlatılmış üç aşaması.<sup>[29]</sup>

( $\mu$ CT), kemik yoğunluğu ve hacmini hesaplama kabiliyeti nedeniyle kemik biyolojisi alanında sıklıkla kullanılan yüksek çözünürlüklü, üç boyutlu görüntüleme yöntemidir. Bu tür analizler, osteomyelit sırasında kemik yıkımını yöneten bakteriyel virülans mekanizmalarını incelemek için model sistemler oluşturur. Ek olarak, osteomyelit sırasında kemiğin yeniden şekillenme sürecini tespit etmek amaçlı yapılan görüntüleme analizleri, osteomyelitin ana morbiditelerinden birini sınırlamada en etkili olan tedavileri tanımlamak için bir fırsat sağlar. Patolojik kemiğin yeniden şekillenmesine karşı koyan ve böylece kemik homeostazı ve vaskülaritesini koruyan yeni terapiler yaratmak, osteomyelit için geleneksel antibiyotik tedavisinin etkinliği artırılabilir.

## BIYOFİLM FİZYOLOJİSİ VE KRONİK OSTEOMİYELİTİN MODELLENMESİ

Antimikrobiyal etkinliği sınırlayan ve osteomyelit sırasında kronik enfeksiyona neden olan önemli bir faktör biyofilm gelişmesidir. Bu nedenle, osteomyelitin hayvan modellerinde yeni terapiler veya aşılarda test edilirken biyofilm fizyolojisinin in vivo olarak etkili bir şekilde modellenmesi önemlidir. Biyofilm gelişmesi sırasında eksprese edilen bakteriyel antijenleri araştırmak ve biyofilm ile ilişkili enfeksiyona konakçı bağışıklık tepkilerini karakterize etmek için osteomyelit modelleri geliştirilmiştir.<sup>[31–33]</sup> Bu modeller, in vivo biyofilm oluşumuna ve terapötik dirence katkıda bulunan unsurların tanımlanmasında önemli bir faydaya sahiptir.<sup>[34]</sup> Ayrıca, biyofilm enfeksiyonunun hayvan modelleri, biyofilm enfeksiyonunun tedavi edilmesi için geleneksel polivalan bir aşı oluşturulmasını kolaylaştırır.<sup>[35]</sup>

Küçük koloni varyantları (SCV'ler), kronik osteomyelitten sıklıkla izole edilen yavaş büyüyen, solunum bozukluğu olan bakterilerdir.<sup>[36]</sup> Birçok antimikrobiyal ajanın etkinliği bakteriyel solunuma ve hücre bölünmesine bağlı olduğundan, SCV'ler kendiliğinden antibiyotik tedavisine dirençlidir. Kronik osteomyelit için tedavilerin etkinliğini uygun şekilde değerlendirmek için, in vivo modeller SCV'leri ve diğer bakteriyel fizyolojik adaptasyonları, ayrıca kemik mimarisini ve vaskülaritesini hesaba katmalıdır. Bu amaçla Horst ve ark., intravenöz enjeksiyondan sonra kronik osteomyelitin tekrarlanabilir şekilde indüklendiği bir fare modeli geliştirmiştir. Kronik osteomyelit, sitokin ve bakteriyolojik analizleri karakterize etmek için kemik enflamasyonunun görüntüleme analizleri ve biyomekanik testler kullanılmışlardır.<sup>[37]</sup> Bu grup ayrıca kronik osteomyelit sırasında SCV gelişimi ve fenotip değişimini analiz etmek için benzer bir hematogen enfeksiyon modeli kullanmıştır.<sup>[38]</sup>

## OSTEOMİYELİT İÇİN LOKAL TEDAVİLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ

Zhou ve ark., *S.aureus* ile sıçanlarda yaptıkları yabancı cisim ilişkili osteomyelit modelinde *curcumin* (zerdeçal) ile eritromisin tedavilerini ayrı ayrı ve kombine olarak karşılaştırmışlar ve kombine tedavinin başarılı olduğunu saptamışlardır.<sup>[39]</sup>

Kussmann ve ark., plazma ömrü çok uzun olduğu için ayaktan parenteral tedavilerde tercih edilen yeni bir antibiyotik olan *dalbavancin*'in (yarı sentetik lipoglikopeptid) etkinliğini sıçanlarda, implant ilişkili osteomyelit modelinde araştırmışlardır. *Dalbavancin*'in, vankomisin tedavisi verilen gruplarda elde edilen başarı ile aynı oranda etkili bir monoterapi olabileceğini saptamışlardır.<sup>[40]</sup>

Bir diğer araştırma konusu ise bakterinin implanta tutunmasını azaltmak ve enfeksiyona bağlı kemik kaybının restorasyonu için implantlar üzerinde yeni kaplamalar yapılmasıdır. Lovati ve ark., E vitamini ile kaplı titanyum tel yerleştirdikleri sıçan femurlarında kaplamanın *S.aureus* osteomyeliti üzerine etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada biyoluminisans görüntüleme ile sonuçları değerlendirmişlerdir. E vitaminine bağlı antimikrobiyal etkinin az ama implant kemik ilişkisinin iyi olduğunu saptamışlardır.<sup>[41]</sup>

Çalışmalarda yeni hedeflerden birisi enfeksiyonun kemik dokuda verdiği hasarın ne derecede olduğu ve tedavi sonucunda ne derecede iyileştiğidir. Guelcher ve ark., bu hasarı engellemek için enfekte sıçan femur kırığı modelinde fizyolojik dozun üzerinde BMP 2 yüklenmiş poliüretan ve kollajen taşıyıcılar ile tedavi uygulamışlar ve greft olarak çok etkili olan bu molekülün enfekte ortamlarda düzenli bir salınım ile sabit bir etkisi olup olmadığını tam olarak ortaya koyamamışlardır.

İmmunoterapinin osteomyelit olgularında etkisini araştıran çalışmalardan birisi Yokogawa ve ark.'nın farelerde plak-vida uyguladıkları enfekte femur kırığı deneyidir. Bu deney iki açıdan yenilik içermektedir. Birincisi, enfekte zeminde plak vida uygulanan deneklerde ameliyat sonrası 7. gün plak-vida çıkartılarak debridmanı takiben tekrar steril plak-vida konarak tek aşamalı implant revizyonunun yapıldığı ilk deneysel modelidir. Diğer yenilik, böyle enfekte ortamlarda patojen etken olan glikozaminidazin (otolizin molekülünün alt ünitesi) bloke edilmesi ile yani anti-glikozaminidaz monoklonal antikoları (anti-GMD) tedavisi ile kombine edilen vankomisin etkinliğinin araştırılmasıdır ve immunoterapi yapılan deneklerde enfeksiyon tam olarak tedavi edilmiştir.<sup>[42]</sup>

Biyofilm tabakasını yok edebilmek için moleküler düzeyde yapılan çalışmalardan ilginç olan bir tanesi de Ahn ve ark.'nın lipoteikoik asit in tedavi edici etkisini araştırdıkları çalışmalarıdır. Çünkü teikoik asit esasen biyofilmin ana maddesi olarak bilinir. Farelerin sırtına yerleştirilen enfekte katater modelinde, laktobasil plantarum'dan elde edilen lipoteikoik asitin *S.aureus* biyofilm tabakasını parçaladığı gösterilmiştir.<sup>[43]</sup>

Antibiyotik taşıyıcı sistem olarak yeni materyaller denenmiş ve Neyisci ile ark., vankomisin (VK) yüklü VK100 silikon sement uygulamasının etkisini sıçan tibiasında yaptıkları implant ilişkili *S.aureus* osteomyelit modelinde araştırmışlardır. Sistemik vankomisin ve lokal taşıyıcı sistem uygulaması arasında istatistiksel bir fark saptanmamıştır.<sup>[44]</sup>

Gamaletsou ve ark., tavşanda *C.albicans* osteomyelitini mikrobiyolojik, antijenik, histolojik ve florodeoksiglukoz - pozitron emisyon tomografisi - bilgisayarlı

tomografi (FDG-PET-BT) çalışmalarını yaparak tanımlamışlardır. Norden'in tibia osteomyelit modelinin modifiye edilmiş halini kullanarak iki tavşanın tibia intramedüller alanına  $10^9$ , dört tavşanın tibia intramedüller alanına  $10^7$  dört tavşanın tibia intramedüller alanına  $10^6$  CFU/mL *C.albicans* inoküle etmişlerdir.  $10^9$  CFU/mL *C.albicans* inoküle edilen iki tavşan *Candida* sepsisinden ölmüştür. Ancak  $10^7$  ve  $10^6$  CFU/mL *C.albicans* inoküle edilen sekiz tavşandan yedisinde osteomyelit gösterilmiştir.<sup>[13,45]</sup>

Harrasser ve ark., Wistar Albino ratların proksimal tibia metafizine açılan delikten  $10^2$  ve  $10^3$  CFU/10 µL *S.aureus* inoküle ederek hidroksiapatit kaplama titanyum vida veya hidroksiapatit-gümüş kaplama titanyum vida ile bu deliği kapatarak implant ile ilişkili osteomyelit modelini oluşturmuşlardır. Bu çalışma sonunda varılan nokta  $10^2$  veya  $10^3$  CFU/10 µL inokülasyonun aslında osteomyelit için yeterli olduğu ve daha yüksek dozdaki inokülasyonlara göre klinik manifestasyonları daha güçlü temsil ettiği yönündedir.<sup>[46]</sup>

Avdeeva ve ark., iki grup 20 adet Wistar Albino rat ile yaptıkları deneyde osteomyelit grubuna düşük virulanslı *S.aureus* suşları ile üç günlük intervaller ile üç doz intraperitoneal enjeksiyon yaparak pre-sensitizasyon yapmışlardır. Ardından steril ortamda femur distaline ulaşarak iğne ucu ile medullaya *S.aureus* inoküle etmişler ve takiplerinde sintigrafi, enfeksiyonun klinik ve laboratuvar parametreleri ve histolojik değerlendirme ile yapılmıştır. Deney hayvanları için mortalite ve morbidite düşünüldüğünde, sensitizasyon yapılmadan inokülasyon yapmanın osteomyelite her zaman neden olmadığı ve bu nedenle tekrarlayan enjeksiyonlar yapmak gerektiğinden bahsedilmiştir.<sup>[47]</sup>

## SONUÇLAR VE GELECEĞE PROJeksiYONLAR

Hayvan osteomyelit modellerindeki yeni ilerlemele, osteomyelit sırasında konakçı-patojen arayüzünün analizini kolaylaştırmıştır. Bakteriyel yüklerin tam olarak ölçülmesi ve kemik yeniden şekillenmesindeki değişiklikler için yeni araçlar, osteomyelit patogenezi için kritik olan bakteriyel faktörlerin belirlenmesine yardımcı olmuştur. Kemik destrüksiyonu ve intraosseöz sağkalım için bakteriyel mekanizmaları hedefleyen yeni tedavilerin geliştirilmesi, geleneksel antimikrobiyal tedavi etkinliğini artıracak ve osteomyelit morbiditesini azaltacaktır. Sürekli lokal ilaç salınımı için biyolojik olarak bozunabilir iskeleler, deneysel kemik enfeksiyonu modellerinde umut vaat etmektedir. Son olarak, kronik osteomyelit ve biyofilm gelişmesine karşı bağışıklık yanıtlarının modellenmesi, kemik enfeksiyonlarını önlemek için aşuların geliştirilmesini kolaylaştıracaktır.



## KAYNAKLAR

1. Reizner W, Hunter JG, O'Malley NT, Southgate RD, Schwarz EM, Kates SL. A systematic review of animal models for *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *Eur Cell Mater* 2014;27:196–212. [Crossref](#)
2. Williams DL, Haymond BS, Woodbury KL, Beck JP, Moore DE, Epperson RT, Bloebaum RD. Experimental model of biofilm implant-related osteomyelitis to test combination biomaterials using biofilms as initial inocula. *J Biomed Mater Res A* 2012;100(7):1888–900. [Crossref](#)
3. Ziegler P, Boettcher S, Takizawa H, Manz MG, Brümmendorf TH. LPS-stimulated human bone marrow stroma cells support myeloid cell development and progenitor cell maintenance. *Ann Hematol* 2016;95(2):173–8. [Crossref](#)
4. Kolb-Mäurer A, Weissinger F, Kurzai O, Mäurer M, Wilhelm M, Goebel W. Bacterial infection of human hematopoietic stem cells induces monocytic differentiation. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004;40(2):147–53. [Crossref](#)
5. Kahle N, Brenner-Weiss G, Overhage J, Obst U, Hänisch G. Bacterial quorum sensing molecule induces chemotaxis of human neutrophils via induction of p38 and leukocyte specific protein 1(LSP1). *Immunobiology* 2013;218(2):145–51. [Crossref](#)
6. Holban A-M, Bleotu C, Chifiriuc MC, Bezirtzoglou E, Lazar V. Role of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing (QS) molecules on the viability and cytokine profile of human mesenchymal stem cells. *Virulence* 2014;5(2):303–10. [Crossref](#)
7. Thurlow LR, Hanke ML, Fritz T, Angle A, Aldrich A, Williams SH, Engebretsen IL, Bayles KW, Horswill AR, Kielian T. *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation in vivo. *J Immunol* 2011;186(11):6585–96. [Crossref](#)
8. Zaatreh S, Wegner K, Strauß M, Pasold J, Mittelmeier W, Podbielski A, Kreikemeyer B, Bader R. Co-culture of *S.epidermidis* and human osteoblasts on implant surfaces: an advanced in vitro model for implant-associated infections. *PLoS One* 2016;11(3):e0151534. [Crossref](#)
9. Raic A, Riedel S, Kemmling E, Bieback K, Overhage J, Lee-Thedieck C. Biomimetic 3D in vitro model of biofilm triggered osteomyelitis for investigating hematopoiesis during bone marrow infections. *Acta Biomater* 2018;73:250–62. [Crossref](#)
10. Tuchscher L, Kreis C, Hoerr V, Flint L, Hachmeister M, Geraci J, Bremer-Streck S, Kiehntopf M, Medina E, Kribus M, Raschke M, Pletz M, Peters G, Löffler B. *Staphylococcus aureus* develops increased resistance to antibiotics by forming dynamic small colony variants during chronic osteomyelitis. *J Antimicrob Chemother* 2016;71(2):438–48. [Crossref](#)
11. Junka A, Szymczyk P, Ziółkowski G, Karuga-Kuzniewska E, Smutnicka D, Bil-Lula I, Bartoszewicz M, Mahabady S, Sedghizadeh PP. Bad to the bone: on in vitro and ex vivo microbial biofilm ability to directly destroy colonized bone surfaces without participation of host immunity or osteoclastogenesis. *PLoS One* 2017;12(1):e0169565. [Crossref](#)
12. Mader JT. Animal models of osteomyelitis. *Am J Med* 1985;78(6B):213–7. [Crossref](#)
13. Norden CW, Kennedy E. Experimental osteomyelitis. I. A description of the model. *J Infect Dis* 1970;122(5):410–8. [Crossref](#)
14. Andriole VT, Nagel DA, Southwick WO. A paradigm for human chronic osteomyelitis. *J Bone Joint Surg Am* 1973;55(7):1511–5. [Crossref](#)
15. Zak O, Zak F, Rich R, Tosch W, Kradolfer F, Scheld WM. Experimental staphylococcal osteomyelitis in rats: therapy with rifampin and cloxacillin alone or in combination. In: Periti P, Grassi GG, editors. *Current Chemotherapy and Immunotherapy*. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1982. p. 973–4.
16. Rissing JP, Buxton T, Weinstein RS, Shockley RK. Model of experimental chronic osteomyelitis in rats. *Infect Immun* 1985;47(3):581–6. [Crossref](#)
17. Gracia E, Lacleriga A, Monzon M, Leiva J, Oteiza C, Amorena B. Application of a Rat Osteomyelitis Model to Compare in Vivo and in Vitro Antibiotic Efficacy against Bacteria with High Capacity to Form Biofilms. *J Surg Res* 1998;79(2):146–53. [Crossref](#)
18. Ferguson K, Lambe Jr D, Keplinger J, Kalbfleisch J. Comparison of the pathogenicity of three species of coagulase-negative *Staphylococcus* in a mouse model with and without a foreign body. *Can J Microbiol* 1991;37(9):722–4. [Crossref](#)
19. Fitzgerald Jr RH. Experimental osteomyelitis: description of a canine model and the role of depot administration of antibiotics in the prevention and treatment of sepsis. *J Bone Joint Surg Am* 1983;65(3):371–80. [Crossref](#)
20. Li D, Gromov K, Soballe K, Puzas JE, O'Keefe RJ, Awad H, Drissi H, Schwarz EM. Quantitative mouse model of implant-associated osteomyelitis and the kinetics of microbial growth, osteolysis, and humoral immunity. *J Orthop Res* 2008;26(1):96–105. [Crossref](#)
21. Brinkman CL, Schmidt-Malan SM, Karau MJ, Patel R. A novel rat model of foreign body osteomyelitis for evaluation of antimicrobial efficacy. *J Exp Appl Anim Sci* 2019;3(1):7. [Crossref](#)
22. Büren C, Hambüchen M, Windolf J, Lögters T, Windolf CD. Histological score for degrees of severity in an implant-associated infection model in mice. *Arch Orthop Trauma Surg* 2019;139(9):1235–44. [Crossref](#)
23. Bottagisio M, Coman C, Lovati AB. Animal models of orthopaedic infections. A review of rabbit models used to induce long bone bacterial infections. *J Med Microbiol* 2019;68(4):506–37. [Crossref](#)
24. Funao H, Ishii K, Nagai S, Sasaki A, Hoshikawa T, Aizawa M, Okada Y, Chiba K, Koyasu S, Toyama Y, Matsumoto M. Establishment of a real-time, quantitative, and reproducible mouse model of *Staphylococcus aureus* osteomyelitis using bioluminescence imaging. *Infect Immun* 2012;80(2):733–41. [Crossref](#)
25. Niska JA, Meganck JA, Pribaz JR, Shahbazian JH, Lim E, Zhang N, Rice BW, Akin A, Ramos RI, Bernthal NM, Francis KP, Miller LS. Monitoring bacterial burden, inflammation and bone damage longitudinally using optical and  $\mu$ CT imaging in an orthopaedic implant infection in mice. *PLoS One* 2012;7(10):e47397. [Crossref](#)
26. Pribaz JR, Bernthal NM, Billi F, Cho JS, Ramos RI, Guo Y, Cheung AL, Francis KP, Miller LS. Mouse model of chronic post-arthroplasty infection: Noninvasive in vivo bioluminescence imaging to monitor bacterial burden for long-term study. *J Orthop Res* 2012;30(3):335–40. [Crossref](#)
27. Reumann MK, Weiser MC, Mayer-Kuckuk P. Musculoskeletal molecular imaging: a comprehensive overview. *Trends Biotechnol* 2010;28(2):93–101. [Crossref](#)
28. Avci P, Karimi M, Sadasivam M, Antunes-Melo WC, Carrasco E, Hamblin MR. In-vivo monitoring of infectious diseases in living animals using bioluminescence imaging. *Virulence* 2018;9(1):28–63. [Crossref](#)

29. Mezzanotte L, van 't Root M, Karatas H, Goun EA, Löwik CWGM. In vivo molecular bioluminescence imaging: new tools and applications. *Trends Biotechnol* 2017;35(7):640–52. [Crossref](#)
30. Hardy J, Chu P, Contag CH. Foci of *Listeria monocytogenes* persist in the bone marrow. *Dis Model Mech* 2009;2(1-2):39–46. [Crossref](#)
31. Brady RA, Leid JG, Camper AK, Costerton JW, Shirtliff ME. Identification of *Staphylococcus aureus* proteins recognized by the antibody-mediated immune response to a biofilm infection. *Infect Immun* 2006;74(6):3415–26. [Crossref](#)
32. Prabhakara R, Harro JM, Leid JG, Harris M, Shirtliff ME. Murine immune response to a chronic *Staphylococcus aureus* biofilm infection. *Infect Immun* 2011;79(4):1789–96. [Crossref](#)
33. Beenken KE, Dunman PM, McAleese F, Macapagal D, Murphy E, Projan SJ, Blevins JS, Smeltzer MS. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol* 2004;186(14):4665–84. [Crossref](#)
34. Weiss EC, Zielinska A, Beenken KE, Spencer HJ, Daily SJ, Smeltzer MS. Impact of sarA on daptomycin susceptibility of *Staphylococcus aureus* biofilms in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(10):4096–102. [Crossref](#)
35. Brady RA, Graeme A, Leid JG, Prior ML, Costerton JW, Shirtliff ME. Resolution of *Staphylococcus aureus* biofilm infection using vaccination and antibiotic treatment. *Infect Immun* 2011;79(4):1797–803. [Crossref](#)
36. Proctor RA, Von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, Peters G. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol* 2006;4(4):295–305. [Crossref](#)
37. Horst SA, Hoerr V, Beineke A, Kreis C, Tuchscher L, Kalinka J, Lehne S, Schleicher I, Köhler G, Fuchs T, Raschke MJ, Rohde M, Peters G, Faber C, Löffler B, Medina E. A novel mouse model of *Staphylococcus aureus* chronic osteomyelitis that closely mimics the human infection: an integrated view of disease pathogenesis. *Am J Pathol* 2012;181(4):1206–14. [Crossref](#)
38. Tuchscher L, Medina E, Hussain M, Völker W, Heitmann V, Niemann S, Holzinger D, Roth J, Proctor RA, Becker K, Peters G, Löffler B. *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO Mol Med* 2011;3(3):129–41. [Crossref](#)
39. Zhou Z, Pan C, Lu Y, Gao Y, Liu W, Yin P, Yu X. Combination of erythromycin and curcumin alleviates *Staphylococcus aureus* induced osteomyelitis in rats. *Front Cell Infect Microbiol* 2017;7:379. [Crossref](#)
40. Kussmann M, Obermueller M, Berndl F, Reischer V, Veletzky L, Burgmann H, Poepl W. Dalbavancin for treatment of implant-related methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in an experimental rat model. *Sci Rep* 2018;8(1):9661. [Crossref](#)
41. Lovati AB, Bottagisio M, Maraldi S, Violatto MB, Bortolin M, Vecchi ED, Bigini P, Drago L, Romanò CL. Vitamin E phosphate coating stimulates bone deposition in implant-related infections in a rat model. *Clin Orthop Relat Res* 2018;476(6):1324. [Crossref](#)
42. Yokogawa N, Ishikawa M, Nishitani K, Beck CA, Tsuchiya H, Mesfin A, Kates SL, Daiss JL, Xie C, Schwarz EM. Immunotherapy synergizes with debridement and antibiotic therapy in a murine 1-stage exchange model of MRSA implant-associated osteomyelitis. *J Orthop Res* 2018;36(6):1590–8. [Crossref](#)
43. Ahn KB, Baik JE, Yun C-H, Han SH. Lipoteichoic acid inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Front Microbiol* 2018;9:327. [Crossref](#)
44. Neyisci C, Erdem Y, Bilekli AB, Demiralp B, Kose O, Bek D, Korkusuz F, Kankilic B. Treatment of implant-related methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis with vancomycin-loaded VK100 silicone cement: An experimental study in rats. *J Orthop Surg* 2018;26(1):2309499017754093. [Crossref](#)
45. Gamaletsou MN, Meletiadis J, Chatzivoannou S, Panayiotides IG, Agadakos E, Katsimpoulas M, Kostomitsopoulos N, Petraitis V, Walsh TJ, Sipsas NV. Experimental *Candida albicans* osteomyelitis: Microbiologic, antigenic, histologic, and 18FDG-PET-CT imaging characteristics in a newly established rabbit model. *Med Mycol* 2019;57(8):1011–7. [Crossref](#)
46. Harrasser N, Gorkotte J, Obermeier A, Feihl S, Straub M, Slotta-Huspenina J, von Eisenhart-Rothe R, Moser W, Gruner P, de Wild M, Gollwitzer H, Burgkart R. A new model of implant-related osteomyelitis in the metaphysis of rat tibiae. *BMC Musculoskelet Disord* 2016;17(1):152. [Crossref](#)
47. Avdeeva EY, Slizovsky G, Skorokhodova M, Fomina TI, Zorkaltsev MA, Zavadovskaya VD, Krasnov EA, Ivanov VV, Stepanov MY. Experimental simulation of traumatic osteomyelitis in rats. *Bull Exp Biol Med* 2016;161(1):137–40. [Crossref](#)