



**T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**RATLARDA LAMİNEKTOMİ SONRASI
GELİŞEN PERİDURAL FİBROZİSTE
BİYOFİZİKSEL BARIYERLERİN
ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

İBRAHİM AKKURT

UZMANLIK TEZİ

KIRIKKALE

2016



**T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**RATLARDA LAMİNEKTOMİ SONRASI
GELİŞEN PERİDURAL FİBROZİSTE
BİYOFİZİKSEL BARIYERLERİN
ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

İBRAHİM AKKURT

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. BÜLENT BAKAR

KIRIKKALE

2016

İÇİNDEKİLER	Sayfa
KISALTMALAR	6
GRAFİK BAŞLIKLARI	8
RESİM BAŞLIKLARI	9
TABLO BAŞLIKLARI	10
ÖZET	14
1. GİRİŞ	16
2. GENEL BİLGİLER	18
2.1. Yara iyileşmesi	18
2.2. Akut inflamasyon	18
2.2.1. İnflamatuvar faz	18
2.2.2. Proliferasyon fazı	21
2.2.3. Maturasyon fazı	23
2.3. Kronik inflamasyon	24
2.3.1. Hipertrofik skar	26
2.4. Peridural fibrozis ve bu fibrozisi önlemede kullanılan bazı metodlar	27
2.4.1. Peridural fibrozis	27
2.4.2. Peridural fibrozisi önlemede kullanılan bazı metodlar	30
2.4.2.1. Steroidler ve steroid olmayan antiinflamatuvar (NSAI) ilaçlar	30
2.4.2.2. ADCON-L	31
2.4.2.3. Hyaluronik asit	32
2.4.3. Peridural fibrozisi önlemede faydalı olabilecek biyofiziksel bariyerler	34
2.4.3.1. Polietilen glikol (PEG)	34
2.4.3.2. Trombositten zengin plazma (platelet rich plasma, PRP)	36
3. MATERYAL VE METOT	39
3.1. Materyal	39
3.2. Metot	40
3.3. Histopatolojik inceleme	41
3.4. “Real time PCR array” gen ekspresyon analizi	43
3.5. İstatistiksel analiz	44
4. BULGULAR	46
4.1. Histopatolojik Bulgular	46
4.1.1. Işık mikroskopisi	46
4.1.2. Histopatolojik evreleme sonuçları	48
4.1.3. Masson Trikrom boyama (MTS) sonuçları	51
4.1.4. Damar sayımı sonuçları	53
4.1.5. Fibroblast sayımı sonuçları	56
4.2. PCR inceleme bulguları	58
5. TARTIŞMA	65
5.1. Histopatolojik evreleme sonuçları	65
5.2. PCR gen ekspresyon analizi sonuçları	68
5.3. Çalışmanın limitasyonları	72
6. SONUÇLAR	73
KAYNAKLAR	75

T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI

Nöroşirürji Anabilim Dalı uzmanlık programı çerçevesinde yürütülmüş olan “Ratlarda laminektomi sonrası gelişen peridural fibroziste biyofiziksel bariyerlerin etkinliğinin değerlendirilmesi” isimli bu deneysel çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **UZMANLIK TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24 Mayıs 2016

Prof. Dr. M. Faik Özveren
Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
Nöroşirürji Anabilim Dalı
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Nebi Yılmaz
Atatürk eğitim ve Araştırma Hastanesi
Nöroşirürji Kliniği

Doç.Dr. Bülent Bakar
Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
Nöroşirürji Anabilim Dalı

TEŞEKKÜR

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak bulunduğum süre içerisinde bu bilim dalında bilgi ve tecrübelerini bana aktaran çok değerli hocalarım Prof. Dr. İsmail Semih Keskil' e, Prof. Dr. Hakan Murat Göksel' e, Prof. Dr. Mehmet Faik Özveren' e, Doç. Dr. Bülent Bakar' a, Yard. Doç. Dr. Mustafa Ömür Kasımcı' a, Yard. Doç. Dr. Mustafa Öğden' e ve Yard. Doç. Dr. Mehmet Hüseyin Akgül' e teşekkürlerimi borç bilirim.

Uzmanlık bitirme tezimin danışmanlığında, oluşturulmasında, yürütülmesinde ve sonlandırılmasında aktardığı tecrübe ve katkılarından dolayı Doç. Dr. Bülent Bakar' a teşekkür ederim. Ayrıca bu tezimin oluşturulmasında katkılarından dolayı Veteriner Patolog Yard. Doç. Dr. Güngör Çağdaş Dinçel' e, Moleküler Biyolog Yard. Doç. Dr. Fatma Azize Budak Yıldırım' a, Moleküler Biyolog Uzm. Aslı Keleş' e ve Veteriner Patolog Prof. Dr. Siyami Karahan' a çok teşekkür ederim.

Çalıştığım süre boyunca yardım ve desteklerini benden esirgemeyen çok değerli çalışma arkadaşlarım Araştırma Görevlisi arkadaşlarım Dr. Egemen Nursoy' a ve Dr. Ulaş Yüksel' e, Sağlık Memuru Neşet Bozbıyık' a, Hemşire Canan Altınbudak' a, Hemşire Tuba Yaka' ya teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelmemde en büyük emeğe sahip olan sevgili annem ve babama, doktorluk mesleğini seçmemde etkin rol oynayan ağabeylerim Uzm. Dr. Alpaslan Akkurt' a ve Uzm. Dr. Adem Akkurt' a ve tanıştığım günden itibaren her türlü desteğini benden esirgemeyen sevgili eşime teşekkürlerimi sunarım.

KISALTMALAR

ADAMS	: A disintegrin and metalloprotease motif
ADAMTS	: A disintegrin and metalloprotease with a thrombospondin motif
ANOVA	: Varyans analizi (analyses of variances)
BAP	: Bilimsel Araştırma Proje Koordinasyon Birimi
BMP	: Kemik morfogenetik protein (Bone Morphogenetic Protein)
BOS	: Beyin-omurilik sıvısı
COX	: Sikloksijenaz (Cyclooxygenase)
CTGF	: Bağ dokusu büyüme faktörü (Connective Tissue Growth Factor)
Cyr-61	:Sistein-zengin anjiyojenik indükleyici-61 (Cysteine-rich angiogenic inducer-61)
df	: Serbestlik dereceleri (degrees of freedom)
ECM	: Ekstrasellüler matriks
ECGF	: Epitelial hücre büyüme faktörü (Epithelial cell growth factor)
EDRF	: Endotel kökenli salgılatıcı faktör (Endotelial Derived Releasing Factor)
EGF	: Epidermal büyüme faktörü (Epidermal Growth Factor)
ELAM-1	: Endotelial lökosit adezyon molekül-1 (Endotelial Leucocyte Adhesion Molecule-1)
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü (Fibroblast Growth Factor)
GAG	: Glikozaminoglikan
HAS	: Hyalüronik asit
ICAM-1	: İntersellüler adezyon molekül-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1)
IFN- γ	: Interferon-gamma
IGF	: İnsulin benzeri büyüme faktörü (Insulin Like Growth Factor)
IL	: İnterlökin

MMP	: Matriks metalloproteinazları
MR	: Manyetik rezonans
MTS	: Massons-Trikrom boyama (Masson-Tricrome Staining)
N	: Denek sayısı
NGF	: Nöral büyüme faktörü (Neural Growth Factor)
NO	: Nitrik Oksit
PAF	: Trombositleri aktive eden faktör (Platelet Activator Factor)
PCR	: Polimerize zincir reaksiyon (Polymerized Chain Reaction)
PDAF	: Trombosit kökenli anjiogenez faktörü (Platelet-derived angiogenesis factor)
PDGF	: Trombosit kökenli büyüme faktörü (Platelet Derived Growth Factor)
PEG	: Aktive polietilen glikol ve polietilen imine
PEO	: Polietilen oksit
PG	: Prostaglandin
PRP	: Trombositten zengin plazma (Platelet Riched Plasma)
S1P	: Sfingosin-1-fostat
SPSS	: Statistical Packages for the Social Science
SS	: Standart sapma
TGF- β	: Transforme edici büyüme faktörü-beta (Transforming Growth Factor- β)
TIMP	: Doku metalloproteinaz inhibitörü (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase)
TNF- α	: Tümör nekrozis faktör-alfa
tPA	: Doku plazminojen aktivatörü (tissue Plasminogen Activator)
TSG	: TNF- α ile stimüle edilmiş gen
TXA	: Tromboksan (Thromboxane)
VCAM-1	: Vasküler hücre adezyon molekülü-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1)
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor)
X ²	: Ki-kare
Z	: Z puanı

GRAFİK BAŞLIKLARI

Grafik 1: Histopatolojik evreleme puanlarına ait bar grafiği

Grafik 2: Masson-Trikrom boyanma evreleme puanlarına ait bar grafiği

Grafik 3: Her bir gruba ait damar sayım sonuçları “error bar” grafiği

Grafik 4: Her bir gruba ait fibroblast sayım sonuçları “error bar” grafiği

Grafik 5: Her bir gruba ait kollajen tip-1 gen ekspresyon analiz sonuçları “error bar” grafiği

Grafik 6: Her bir gruba ait kollajen tip-3 gen ekspresyon analiz sonuçları “error bar” grafiği

Grafik 7: Her bir gruba ait TGF-1 β gen ekspresyon analiz sonuçları “error bar” grafiği

Grafik 8: Her bir gruba TNF- α gen ekspresyon analiz sonuçları “error bar” grafiği

RESİM BAŞLIKLARI

Resim 1: Laminektomi sonrası omuriliğin makroskopik görünümü ve ilgili deneysel

farmakolojik ajanların uygulanması sonrası omuriliğin makroskopik görünümü

Resim 2: KONTROL grubuna ait histopatolojik görüntüleme (H&E, X400 ve MTS, X400)

Resim 3: SHAM grubuna ait histopatolojik görüntüleme (H&E, X400 ve MTS, X400)

Resim 4: HAS grubuna ait histopatolojik görüntüleme (H&E, X400 ve MTS, X400)

Resim 5: PEG grubuna ait histopatolojik görüntüleme (H&E, X400 ve MTS, X400)

Resim 6: PRP grubuna ait histopatolojik görüntüleme (H&E, X400 ve MTS, X400)

TABLO BAŞLIKLARI

Tablo1:Histopatolojik evreleme tablosu

Tablo2: Histopatolojik inceleme sonuçlarına ait tanımlayıcı tablo (N: grup içi denek sayısı: SS: standart sapma)

Tablo 3: Tüm grupların histopatolojik evreleme sonuçlarının istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında gruplar arasında belirgin istatistiksel fark saptandı. *Kruskal Wallis* testi; $p<0.05$ (X^2 : ki-kare, df: serbestlik dereceleri)

Tablo 4: Histopatolojik evreleme sonuçları bakımından grupların ikili istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında sadece KONTROL grubunun verileri ile diğer grupların verileri arasında belirgin istatistiksel fark saptandı. *Mann Whitney U* testi ve *Bonferroni düzeltme* testi; $p<0.005$ (Z: Z puanı)

Tablo 5: KONTROL grubu hariç tutulduğunda histopatolojik evreleme sonuçları bakımından gruplar arasında farklılık olduğu saptandı. *Kruskal Wallis* testi, $p<0.05$ (X^2 : ki-kare, df: serbestlik dereceleri).

Tablo 6: Grupların ikili karşılaştırılması sonrasında PRP ve PEG gruplarının histopatolojik evreleme puanlarının diğer gruplardan düşük olduğu saptandı. *Mann Whitney U* testi ve *Bonferroni düzeltme* testi; $p<0.0083$ (Z: Z puanı)

Tablo 7: MTS evreleme puanlarına ait tanımlayıcı tablo (N: grup içi denek sayısı: SS: standart sapma)

Tablo 8: Tüm grupların MTS evreleme puanlarının istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında gruplar arasında belirgin istatistiksel fark saptandı. *Kruskal Wallis* testi; $p<0.05$ (X^2 : ki-kare, df: serbestlik dereceleri).

Tablo 9: MTS evreleme puanlarına göre grupların ikili karşılaştırılması sonrasında PRP grubunun evreleme puanlarının SHAM grubundan daha düşük olduğu saptandı. Mann Whitney U testi ve *Bonferroni düzeltme* testi; $p < 0.005$ (Z: Z puanı).

Tablo 10: MTS evreleme puanlarına göre KONTROL grubu hariç tutulduğunda tüm grupların istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında gruplar arasında belirgin istatistiksel fark saptandı. *Kruskal Wallis* testi; $p < 0.05$ (X^2 : ki-kare, df: serbestlik dereceleri).

Tablo 11: MTS evreleme puanlarına göre grupların ikili karşılaştırılması sonrasında PRP ve PEG gruplarının evreleme puanlarının diğer gruplardan düşük olduğu saptandı. Mann Whitney U testi ve *Bonferroni düzeltme* testi; $p < 0.0083$ (Z: Z puanı).

Tablo 12: Damar sayımı sonuçlarına ait tanımlayıcı tablo (N: grup içi denek sayısı: SS: standart sapma)

Tablo 13: Tüm grupların damar sayımı sonuçlarının istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında gruplar arasında belirgin istatistiksel fark saptandı. *One-Way ANOVA* testi; $p < 0.05$ (df: serbestlik dereceleri).

Tablo 14: Damar sayımı sonuçlarına göre grupların ikili karşılaştırılması sonrasında HAS, PRP ve PEG gruplarının damar sayım sonuçlarının diğer gruplardan düşük olduğu saptandı. *One-Way ANOVA-Tukey HSD Multiple Comparisons* testi $p < 0.05$.

Tablo 15: KONTROL grubu dışarıda bırakıldığında tüm grupların damar sayımı sonuçlarının istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında gruplar arasında belirgin istatistiksel fark saptandı. *One-Way ANOVA* testi; $p < 0.05$ (df: serbestlik dereceleri).

Tablo 16: KONTROL grubu dışarıda bırakılarak yapılan grupların ikili karşılaştırılması sonrası HAS, PRP ve PEG gruplarının damar sayım sonuçlarının diğer gruplardan düşük olduğu saptandı. *One-Way ANOVA-Tukey HSD Multiple Comparisons* testi, $p<0.05$

Tablo 17: Fibroblast sayımı sonuçlarına ait tanımlayıcı tablo (N: grup içi denek sayısı: SS: standart sapma)

Tablo 18: Tüm grupların fibroblast sayımı sonuçlarının istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında gruplar arasında belirgin istatistiksel fark saptandı. *One-Way ANOVA* testi; $p<0.05$ (df: serbestlik dereceleri).

Tablo 19: Grupların ikili karşılaştırılması sonrasında HAS, PRP ve PEG gruplarının fibroblast sayım sonuçlarının diğer gruplardan düşük olduğu saptandı. *One-Way ANOVA-Tukey HSD Multiple Comparisons* testi, $p<0.05$

Tablo 20: KONTROL grubu dışarıda bırakılarak yapılan istatistiksel analizde fibroblast sayım sonuçlarının tüm gruplar arasında farklı olduğu gözlemlendi. *One-Way ANOVA* testi; $p<0.05$ (df: serbestlik dereceleri).

Tablo 21: KONTROL grubu dışarıda bırakılarak yapılan grupların ikili karşılaştırılması sonrasında HAS, PRP ve PEG gruplarının fibroblast sayım sonuçlarının salt cerrahi grubundan düşük olduğu saptandı. *One-Way ANOVA-Tukey HSD Multiple Comparisons* testi, $p<0.05$

Tablo 22: Kollajen tip 1, kollajen tip 3, GF-1 β ve TNF- α gen ekspresyon analiz sonuçlarına ait tanımlayıcı tablo (N: grup içi denek sayısı: SS: standart sapma)

Tablo 23: Tüm grupların kollajen tip 1, kollajen tip 3 ve TGF-1 β gen ekspresyon analiz sonuçlarının istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında gruplar arasında belirgin istatistiksel fark saptandı. *Kruskal Wallis* testi; $p < 0.05$ (X^2 : ki-kare, df: serbestlik dereceleri).

Tablo 24: Tüm grupların istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında PRP isimli etken maddenin kollajen tip 1, kollajen tip 3 ve TGF-1 β düzeylerini belirgin oranda azaltırken PEG isimli ajanın sadece kollajen tip 3 ve TGF-1 β düzeylerini belirgin oranda azalttığı tespit edildi. *Mann Whitney U* testi ve *Bonferroni düzeltme* testi; $p < 0.005$ (Z: Z puanı)

Tablo 25: KONTROL grubu verileri dışlandığında diğer grupların kollajen tip 1, kollajen tip 3 ve TGF-1 β gen ekspresyon analiz sonuçlarının istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında gruplar arasında belirgin istatistiksel fark saptandı. *Kruskal Wallis* testi; $p < 0.05$ (X^2 : ki-kare, df: serbestlik dereceleri).

Tablo 26: Tüm grupların istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında PRP ve PEG isimli etken maddenin kollajen tip 1, kollajen tip 3 ve TGF-1 β düzeylerini belirgin ve benzer oranda azalttığı tespit edildi. *Mann Whitney U* testi ve *Bonferroni düzeltme* testi; $p < 0.0083$ (Z: Z puanı)

ÖZET

Akkurt, İ., Ratlarda laminektomi sonrası gelişen peridural fibroziste biyofiziksel bariyerlerin etkinliğinin değerlendirilmesi, Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Kırıkkale, 2016.

Spinal cerrahi sonrası oluşan peridural fibrozis nöral elemanların ve özellikle spinal sinirlerin etrafını sıkıca sarıp baskı bulgularına yol açabilmekte ve %1-48 hastada cerrahi öncesi klinik bulgulara benzer bulguların tekrarına neden olabilmektedir. Bu durum ise hem hasta için, hem doktor için ve hem de ekonomik yönden yıpratıcı bir süreç olarak karşımıza çıkmaktadır. Tüm bu nedenlerle bu inflamatuvar süreci durdurmaya ya da en azından azaltmaya yönelik medikal literatürde çalışmalar halen devam etmekte olup henüz ekonomik ve faydalı bir metot, teknik ya da farmakolojik ajan ortaya konamamıştır. Bu deneysel çalışma “hyaluronik asit (HAS)”, “polietilen glikol ve polietilen imine (PEG)” ve “trombositten zengin plazma (PRP)” bariyerleri kullanılarak peridural fibrozisi azaltmada etkin bir çözüm bulmaya yönelik olarak planlanmıştır. Bu deneysel çalışmada 34 adet Wistar albino rat randomize şekilde 5 gruba ayrılmıştır. DONÖR grubu (abdominal aortadan tüm vücut kanları toplanıp trombositten zengin plazma elde edildi; n:2); KONTROL grubu (hiçbir cerrahi girişim uygulanmadı ve hiçbir deneysel farmakolojik ajan verilmedi; n: 8); SHAM grubu (cerrahi girişim uygulandı ancak deneysel farmakolojik ajan uygulanmadı; n: 5); HAS grubu (cerrahi girişim uygulandı ve cerrahi alana hyaluronik asit bariyer bırakıldı; n: 5); PRP grubu (cerrahi girişim uygulandı ve cerrahi alana PRP bariyer bırakıldı; n: 7); PEG grubu (cerrahi girişim uygulandı ve cerrahi alana PEG bariyer bırakıldı; n: 7). Cerrahi uygulama metodu olarak deney hayvanlarının sedasyon anestezisi uygulanması sonrası DONÖR ve KONTROL grubundaki denekler hariç diğer deneklere spinal korda zarar vermeden L3-L4-L5 aralığından laminektomi uygulandı ve spinal kord durası açığa çıkarıldıktan sonra yukarıda tarif edilen ilgili gruplara ilgili farmakolojik ajan uygulaması evresine geçildi. Belirtilen işlemlerden sonra cerrahi katlar anatomiye uygun şekilde kapatılıp ratlar sedasyon anesteziden çıkarıldı. Altı haftanın sonunda tüm hayvanlara ötenazi

uygulandı ve tüm deneklerin spinal vertebral kolonu blok halinde çıkarılıp histopatolojik incelemeye ve polimerize zincir reaksiyon (PCR) gen ekspresyon analizine tabi tutuldu. Deney sonunda HAS, PEG ve PRP isimli etken maddelerin cerrahi yapılan alanda damarlanmayı ve fibroblast göçünü normal doku düzeyine yaklaştırmaya da salt cerrahi yapılan dokuya göre belirgin ve benzer düzeyde azaltabildiği gözlemlendi. Ayrıca PEG ve PRP isimli etken maddelerin peridural fibrozis oluşumunda yer alan kollajen tip1, kollajen tip 3 ve transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF-1 β) gen ekspresyon düzeylerini normal doku düzeyine yaklaştırmaya da salt cerrahi yapılan dokuya göre belirgin ve benzer düzeyde azalttığı gözlemlendi. Ancak bu etken maddelerin tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α) ve interferon-gamma (IFN- γ) gen ekspresyon düzeyleri üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığı saptandı. PEG ve PRP isimli deneysel farmakolojik ajanların ratlarda oluşturulan laminektomi modelinde peridural fibrozis oluşumunu normal doku düzeyine yaklaştırmaya da salt cerrahi yapılan dokuya göre belirgin ve benzer düzeyde azalttığı gözlemlendi. Bu bulgularla bu etken maddelerin klinikte hastalar üzerinde kullanımının faydalı olabileceği düşünüldü.

Anahtar kelimeler: Spinal cerrahi, peridural fibrozis, hyalüronik asit, polietilen glikol ve polietilen imine, trombosit zengin plazma (PRP), dural bariyer.

Destekleyen Kurumlar: Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje (BAP) Koordinasyon Birimi ((BAP Numarası: 2014/ 75)

1. GİRİŞ:

Yara iyileşmesi fizyolojik bir süreç olup özellikle cerrahi travma sonrası dokuların anatomik fonksiyonel bütünlüğünün korunmasında elzemdir. Burada yara iyileşmesinde önemli olan ise en az fibrotik ve konektif doku oluşumu ile beraber en fazla anatomik düzelme –cerrahi öncesi normal doku bütünlüğüne nerede ise benzer olacak şekilde- bir iyileşmenin sağlanmasıdır. Ancak çoğu cerrahi travma sonrası cerrahi alanda yeni bağ dokusu (nedbe=skar) oluşmakta ve doku normal dokuların fonksiyonlarını negatif yönde etkilemektedir. Spinal cerrahi sonrası oluşan bu yoğun skar dokusu peridural fibrozis adıyla adlandırılmaktadır. Oluşan bu fibrotik doku nöral elemanların ve özellikle spinal sinirlerin etrafını sıkıca sarıp baskı bulgularına yol açabilmekte ve hastada cerrahi öncesi klinik bulgulara benzer bulguların tekrarına neden olabilmektedir. Bu sürecin sonucu olarak yaklaşık %1-48 hasta tıbbi fayda görememekte ve tekrar ameliyat edilme sınırlarına kadar ulaşabilmektedir. Bu durum ise hem hasta hem doktor ve hem de ekonomik yönden yıpratıcı bir süreç olarak karşımıza çıkmaktadır. Tüm bu nedenlerle bu inflamatuvar süreci durdurmaya ya da en azından azaltmaya yönelik medikal literatürde çalışmalar halen devam etmekte olup henüz ekonomik ve faydalı bir metod, teknik ya da farmakolojik ajan ortaya konamamıştır.

Cerrahi sonrası oluşan peridural fibrozisin patogenezinde fibroblastlar ve bunların sentezlediği kollajen proteini sorumlu tutulmakta olup bunların kaynağı olarak da cerrahi sırasında oluşan kanama, periostun fibröz yaprağı ve paravertebral derin adele grupları gösterilmektedir.

Bu fibrozis oluşumuna yönelik literatürde bazı biyofiziksel bariyerlerin ve bazı farmakolojik ajanların etkinliği araştırılmış ancak henüz optimum düzeyde etkin bir çözüm üretilenmemiştir. Çünkü bu fibrozisi önlemeye yönelik uygulanan birçok materyal ya ekonomik olarak pahalı, ya vücuda yabancı cisim etkisine sahip, ya enfeksiyon riski taşımakta ya da omurilik kanalına baskı uygulayıcı etkiye sahiptir.

Hyalüronik asit (HAS) adı verilen kimyasal ajanın insan vücudunda da sentezlendiği ve vücut dokuları ile uyumlu bir madde olduğu yapılan araştırmalarda gösterilmiştir. Literatürde bu maddenin peridural fibrozis oluşumunu azaltma yönünde belirgin etkileri olduğu gösterilmiş olup çoğu klinikte kullanılmaktadır.

Polietilen glikol (PEG) adı verilen kimyasal madde ise nötral ve vücut dokuları ile uyumlu hidrofilik karakterde bir polimer olmasına ve biyolojik bariyer olarak klinikte birçok alanda kullanılmasına rağmen nöroşirurji alanında beyin-omurilik sıvısı (BOS) kaçaklarını önlemek için dural bariyer olarak henüz yeni kullanılmaya başlanmış olup peridural fibrozis oluşumu üzerine etkileri hakkında yeterli bilimsel veri bulunmamaktadır.

Trombositten zengin plazma (PRP), ortopedi ve romatoloji klinikleri başta olmak üzere birçok alanda medikal tedavide kullanılan otojen bir materyaldir. Ancak peridural fibrozis oluşumu üzerine etkileri henüz tam araştırılmamıştır.

Bu deneysel çalışma etkin bir çözüm bulmaya yönelik olarak planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yara iyileşmesi

Yaralanma fonksiyonel ya da anatomik olarak doku ya da organ bütünlüğünün bozulması şeklinde kısaca tarif edilebilir. Yaralanma sonrası gelişen bir dizi olay doku/ organ/ organizma bütünlüğünü yeniden sağlamayı/ iyileştirmeyi amaçlar (77). Yara iyileşmesinin dört farklı sonuca gidiş olasılığı vardır. Bunlar aşağıda kısaca sıralanmıştır:

- *Birincisi* tam iyileşmedir ki bu olayda kimyasal medyatörler nötralize olur, damar yatağı eski haline döner, lenfatik drenaj ve makrofajlar tarafından nekrotik artıklar ortadan kalkar, ödem gider ve doku eski haline döner.
- *İkincisi* rejenerasyonu tam olmayan ve bağ dokusu ile organize olarak iyileşen fibrozis dokusunun oluşmasıdır.
- *Üçüncüsü* piyojenik enfeksiyona gidiş ve abse formasyonu gelişmesidir.
- *Dördüncüsü* ise kronik inflamasyon gelişimidir.

2.2. Akut inflamasyon

Yara iyileşmesinin akut inflamasyon süreci *inflamasyon*, *proliferasyon* ve *matürasyon* (yeniden modelleme) fazlarını içerir.

2.2.1. İnflamatuar faz:

Yaralanmayı takiben yara bölgesindeki yıkıma uğramış damarlar hemen daralır ve subendotelial alandan ve endotelden tromboplastik doku ürünleri salınmaya başlar. Bu arada damarların hasarlı bölgesinde trombositler kümelenerek ilk hemostatik tıkaçı oluşturur. Eş zamanlı olarak pıhtılaşma ve kompleman sistemleri harekete geçerken intrinsik ve ekstrinsik pıhtılaşma sistemleri protrombini trombine dönüştürür. Takiben aktive trombin fibrinojeni fibrine dönüştürür ve bu da trombusun oluşumunu ve hemostazı sağlar. Kümelenmiş trombositler degranüle olarak inflamatuvar hücreleri yara bölgesine yönlendiren kemoaktif maddeleri, fibroblast aktivasyon faktörlerini ve vazokonstriktörleri ortama salarlar. Hasarlı bölgeye ilk gelen inflamatuvar hücreler arasında nötrofiller çoğunluktadır. Lökosit

hareketlerinde süreç staz sırasında hücrelerin damar içinden damar çeperine doğru yer değiştirmesi ile başlar (marginasyon), ardından damar endoteline zayıf olarak yapışır ve yuvarlanır (rolling). Endotelle karşı karşıya gelen lökositler endotelle sıkı bir yapışıklık oluşturup yapışma (adezyon) işlemini gerçekleştirirler. Bu yapışma endotel hücre yüzeyindeki adezyon molekülleri olan endotelyal lökosit adezyon molekül-1 (ELAM-1), intersellüler adezyon molekül-1 (ICAM-1), vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1), CD34 ile lökositlerdeki reseptörlerin (sialyl Lewis X, L-selectin gibi) etkileşimi ile gerçekleşir (29, 30, 60, 61, 61). Adezyon ardından lökositler öncelikle endotel hücre aralıklarına girer ve kollejenaz salgılayarak bazal membranı delerek damar dışına çıkarlar (transmigrasyon). Nötrofiller, monositler, eozinofiller ve bazofiller de aynı yoldan reaksiyon oluştururlar. Aynı zamanda mikrovasküler alanda yapısal değişikliğe bağlı olarak permeabilite artışı olur ve lökositlerle birlikte proteinden zengin sıvı (eksudasyon) da intertisyel aralığa sızar. Damar dışına çıkış yapan lökositler kemotaktik ajanların etkisiyle hasarlı alana doğru ilerler (kemotaksi). Lökositlerin aktivasyonu kemotaktik ajanların spesifik lökosit reseptörlerine bağlanması ile gerçekleşir. Kemotaksi ile hasarlı alana ulaşan lökositlerin amacı hasarlayıcı ajanı yok etmektir (fagositoz). Fagositozda, yaralanmaya neden olan etken lökosit tarafından tanınır, etken tanıldıktan sonra lökosit etkene yapışır ve içine alarak yutar ve parçalayarak yok eder. Lökositlerin etkeni tanımada serumda bulunan IgG ve C3b opsoninler oldukça önemlidir. Bu maddelerle kaplanan mikroorganizmalar kolayca tanınıp yok edilir. Opsoninler lökositler üzerinde bulunan FcR ve C3b gibi özel reseptörlere bağlanırlar. Reaktif oksijen radikalleri ve lizozomal enzimler tehdit oluşturan ajanın fagositozla yok edilmesini sağlar (61, 62). Akut inflamasyonda rol alan kimyasal ajanlar aşağıda sıralanmıştır:

- *Vazoaktif aminler*: Histamin ve serotonin akut inflamasyonda permeabilite artışından sorumludur (9).
- *Plazma proteazları*: Kinin sistemi, kompleman sistemi, pıhtılaşma sistemi. Hageman faktör bu üç sistemin de aktivasyonunu başlatır. Hageman faktör karaciğerde üretilir

plazmada inaktif şekilde bulunur ve kollajen, bazal membran veya aktive olmuş trombositlerle karşılaştığında aktive olur (47).

- *Lipid kökenli mediatörler:* Bu grupta araşidonik asit metabolitleri olan prostaglandinler ve lökotrienler bulunur. Bunlar inflamatuvar stimulus veya C5a gibi mediyatörlerle oluşan fosfolipaz aktivasyonu sonucu meydana gelen membran fosfolipidlerinden açığa çıkan poliansatüre yağ asitleridir (17).
- *Trombositleri aktive eden faktör (PAF):* Mast hücresi ve bazofil başta olmak üzere birçok hücreden salınan fosfolipid kökenli bir mediyatördür. Vasküler permeabilite artışı, lökosit agregasyonu/ adhezyonu/ kemotaksisi sağlar. Trombositleri aktive ederek diğer mediyatörlerin salınımını da stimüle eder (1).
- *Nitrik Oksit (NO):* Serbest radikal ve gaz olan nitrik oksit endotel kökenli gevşetici faktör (EDRF) benzeri etki gösterir. Endotelden, makrofajlardan ve beyindeki nöronlardan da salınır. NO damar duvarındaki düz kasları gevşeterek vazodilatasyona, ayrıca trombositlerde agregasyona ve adhezyona neden olur (8, 19).
- *Lökositik lizozomal enzimler:* Elastaz, kollejenaz, katepsin gibi enzimlerdir. Lökosit ve makrofajlardan salınırlar ve doku hasarına yol açan enzimlerin kemotaktik ve vasküler geçirgenliğini artırıcı etkileri vardır (61, 62).
- *Serbest oksijen radikalleri:* Lökositler tarafından kemotaktik ajan ve immün kompleksler gibi uyarıcılar varlığında ekstrasellüler sahaya salınan süperoksit iyonu, hidroksil iyonu, hidrojen peroksit gibi metabolitlerdir. Bu metabolitler endotel hasarı oluşturarak vasküler permeabilitede artış ve lökosit transmigasyonunu kuvvetlendirirler. Antiproteazları inaktive ederek lökositik kökenli proteaz aktivasyonunun artışı sağlarlar (8, 19).
- *Antioksidan mekanizmalar:* Organizmanın antioksidan koruyucu mekanizmaları da vardır. Bir serum proteini olan seruloplazmin, transferrin, süperoksit dismutaz, katalaz enzimi ve glutatyon peroksidaz bu mekanizmaların örneklerini oluşturur (17)

- *Sitokinler*: Sitokinler hücrel düzenleyici proteinlerdir. Sitokinler başlıca büyüme faktörleri, lenfokinler, koloni stimüle edici faktörler, transforme edici faktörler, tümör nekroz faktörleri ve interferonlar olarak sayılabilir (47).

İki-üç gün içinde inflamatuvar hücreler arasında monosit hakimiyeti görülür. Kanda dolaşan monositler yara bölgesine göç eder ve makrofajlara dönüşür. Makrofajlar doku ve bakteri yıkım ürünlerini fagosite eder ve büyüme faktörleri salgırlar. Bu büyüme faktörleri endotelial hücreleri, fibroblastları ve keratinositleri aktive ederek bu hücrelerin onarım sürecindeki görevlerini yerine getirmelerini sağlar. Makrofajlardan salınan yirmiden fazla sitokin ve büyüme faktörü saptanmıştır. Monosit ve makrofajların yaradan uzaklaştırılması yara iyileşmesinde önemli derecede yavaşlamaya, fibroblast proliferasyonunun gecikmesine ve anjiogenezin bozulmasına yol açar (8, 19).

2.2.2. Proliferasyon fazı:

Proliferasyon fazında fibroplazi, granülasyon, kontraksiyon ve epitelizasyon gerçekleşir.

Granülasyon dokusu oluşumu: Yaralanmadan yaklaşık 4 gün sonra, geçici ekstrasellüler matriks (ECM), granülasyon dokusuyla yer değiştirmeye başlar. Kapillerler, fibroblastlar ve fibroblastlar tarafından oluşturulan kollajen ve kan damarları granülasyon dokusunu oluşturmaya başlar (35). Burada fibroblastların hem “üretim” hem de “mekanik” görevleri vardır. Fibroblastlar geçici matriksin yerini alacak olan kollajen kökenli matriksin üretiminden sorumludur. Mekanik görevleri ise kontraktıl özellikleri yoluyla yara kontraksiyonunu sağlarlardır.

Migrasyon: Fibroblast migrasyonunu sağlayan başlıca sitokinler şunlardır: trombosit kökenli büyüme faktörü (Platelet Derived Growth Factor=PDGF), nöral büyüme faktörü (Neural Growth Factor=NGF), transforme edici büyüme faktörü-beta (Transforming Growth Factor- β =TGF- β), bağ dokusu büyüme faktörü (Connective Tissue Growth Factor=CTGF) ve Cysteine-zengin anjiyojenik indükleyici-61 (Cysteine-rich angiogenic inducer 61=Cyr-61)

(94). Aynı zamanda geçici matriksin içeriğinde yer alan fibronektin de fibroblastları yara bölgesine çeker (46). Hücre yüzeyinde bulunan integrinler fibroblastlarla ekstrasellüler matriks arasındaki ilişkiyi kolaylaştırır (5). İntegrinler onarım sırasında hücre fonksiyonunu kontrol eden düzenleyiciler olup heterodimerik yapıdadırlar ve birbiriyle ilişkiye girerek aktif protein reseptörünü oluşturan α ve β alt üniteleri vardır. İntegrin ligandları büyüme faktörleri, kollajen ve elastini kapsayan ekstrasellüler matriks (ECM) bileşenleridir. Fibroblastlar yara bölgesine fibrillere paralel olarak hareket ederler. Fibroblastlar bu göçleri sırasında hücrel yıkım ürünleri ve matriks fibrilleriyle karşılaşır. Bu engelleri çeşitli matriks metalloproteinazları (MMP) yardımıyla aşarlar. Şimdiye kadar 24 farklı MMP tanımlanmıştır (66). Bunlardan MMP-1, MMP-2 ve MMP-3 TGF- β tarafından; MMP-19 ise TNF- α tarafından stimüle edilirler. MMP'lerin anjiogenez ve fibroblast göçünde önemli rolleri olup ECM'yi tanıma ve yıkma yeteneğine sahiptirler.

ECM üretimi ve büyüme faktörlerinin salınması: Fibroblastlar kalıcı ekstrasellüler matriks elemanlarını (kollajen, glikozaminoglikan (GAG, proteoglikan) ve büyüme faktörlerini üretmekten sorumludurlar. Kollajen üretimi doku hasarının yaklaşık üç ile beşinci gününde başlar ve PDGF, TGF- β , epidermal büyüme faktörü (Epidermal Growth Factor=EGF), IGF1, fibroblast büyüme faktörü-2 (Fibroblast Growth Factor=FGF-2), CTGF, Cyr-61, sfingozin-1-fosfat (Sphingosine-1-phosphate=S1P) tarafından stimüle edilirler (51).

Kollajen sentezinde ilk aşama bir kollajen prekürsörü olan prokollajenin sentez edilmesidir (5). Bu işlem membrana bağlı ribozomlarda meydana gelir. Prokollajen suda kolaylıkla çözünür ve bu özelliği onun hücre içerisinde rahatça taşınabilmesi için gereklidir. Hücre içi prokollajen sentezinde en önemli aşama lizin ve prolinin endoplazmik retikulumda hidroksilasyonudur. Bu aşama, prokollajen moleküllerinin sonradan hücre dışında meydana gelecek agregasyonu ve fibrillerin oluşumu için gereklidir. Prokollajen zincirleri hücre dışına salınmalarını takiben hücre dışında bir dizi enzimatik işlemde geçerek fibrilleri oluşturmak üzere birleşirler.

Proliferasyon fazında gerçekleşen diğer bir olay da anjiogenezdır (11). Doku hasarının ikinci gününde endotelial hücreler geçici ECM üzerinde fibroblastlara benzer şekilde göç ederler. Endotelial hücrelerin hareketi vasküler endotelial büyüme faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor=VEGF), FGF, anjiopietin ve TGF- β tarafından stimüle edilir (5). Ayrıca ECM'nin kendisi de endotelial hücreler için bir stimülandır. Endotelial hücreler üzerlerinde bulunan integrin reseptörleri sayesinde ECM'yi tanırlar. VEGF, FGF ve TGF- β bu reseptörlerin hücre yüzeyindeki sayısını artırır.

MMP'ler anjiogeneizde önemli görev alırlar (66). MMP'lerin görevi bazal membranın yıkımı ve ECM'nin endotelial hücrelerin geçişine izin verecek şekilde yıkımıdır. MMP-1, MMP-2, MMP-9, MT-MMP ve MMP-19 anjiogeneizde rol alan en önemli matriks metalloproteinazlardır (5). MMP-1 tip I kollajen matriks içine endotelial hücre migrasyonu için gereklidir (31). MMP-2 endotelial hücre yüzeyindeki integrinler aracılığıyla endotelial hücrelere yapışır ve endotelial hücreler ilerlerken önlerine çıkan geçici ECM'yi parçalayarak endotelial hücrelerin ilerlemelerini sağlar (5).

2.2.3. *Matürasyon fazı*

Bu faz yara iyileşmesinin en uzun süren aşamasıdır (20). İnsanlarda yara matürasyonu -klinik olarak- yara kontraksiyonu kızarıklık ve yara kalınlığında azalma, yara kuvvetinde artma ile karakterizedir. Yara kontraksiyonu yaralanmayı takiben dört ile beşinci günde başlar (5, 11, 35). Yara kontraksiyonu myofibroblastlar sayesinde sağlanır. Myofibroblastlar hücre içi aktin filamentleri içeren fibroblastlardır ve bu hücreler kontraksiyon özelliği gösterirler. Myofibroblastlar üzerlerindeki integrin molekülleri sayesinde ECM'ye tutunurlar. Matürasyon fazında yara kalınlığı azalırken yaranın tensil (gerilmeye dayanım) kuvveti artar (5). Bu ECM'nin yeniden modellenmesiyle ilişkilidir. Net kollajen üretimi yaralanmadan sonra ortalama yirmi birinci güne kadar sürekli bir artış gösterir. Bu aşamadan sonra kollajen sentezinde bir azalma gözlenir (35). ECM'deki artmış kollajen miktarının geri beslemeyle fibroblastlardaki kollajen sentezini azalttığı

düşünülmektedir (84). Bunun yanında IFN- γ ve TNF- α fibroblastların kollajen sentezini azaltmada etkilidir (13). Yara iyileşmesinin 21. gününde maksimum kollajen miktarına ulaşılsa da yaranın tensil kuvveti normalin ancak % 20'si kadardır. Altıncı haftada yaranın tensil kuvveti olması gerekenin % 80'ine ulaşır. Yirmi birinci gün ile altıncı hafta arasında geçen ve yara kuvvetinin arttığı bu dönemde gerçekleşen temel olay kollajen yıkımı ve yeniden düzenlenmesidir (5, 35). Kollajen yıkımı esas olarak MMP ve doku metalloproteinaz inhibitörü (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase=TIMP) üretimi ile ilişkilendirilmiştir. ECM yeniden modellemesi aşamasından önce MMP-2, MMP-1, MMP-9 ve TIMP-1 düzeylerinde bir azalma gözlenir (63). Bu nedenle MMP'lerin ve TIMP'lerin uyumlu bir şekilde üretilmesi sağlıklı yara matürasyonu açısından önemlidir. Matürasyon fazında ECM niteliğinde belirgin değişiklikler meydana gelir. Zamanla Tip I kollajen miktarı artarken Tip III kollajen, proteoglikan ve su miktarı azalır. Kollajen fibrillerinin kalınlığı ve interfibriller bağlanma atar ve fibriller yeniden düzenlenir. Yara iyileşmesinin erken dönemlerine kollajen fibrilleri düzensiz şekilde dizilmişlerdir. Bu, iyileşmenin erken dönemindeki yüksek kollajen miktarına rağmen yara kuvvetindeki zayıflığı açıklar (58, 87). Skar matürasyonu ile beraber klinik olarak gözlemlenen kızarıklık azalışı yara içindeki kapillerlerin yoğunluğunun değiştiğini gösterir. Matür skar, granülasyon dokusuna oranla daha az kapiller damar içermektedir (85).

2.3. Kronik inflamasyon

Kronik inflamasyon olayı ya en baştan kroniktir ya da akut inflamasyon sonrası gelişir. Akut inflamasyonda kronik inflamasyona geçiş dokunun zedelenmesine yol açan süreç devam ediyorsa gerçekleşir. Kronik inflamasyonda en önemli hücreler kemik iliğinden plazmaya monosit olarak geçen ve dokulara makrofaj olarak yerleşen IFN- γ ile aktive olan hücrelerdir. Doku hasarına sebep olan mediyatörlerin ve fibrozise neden olan ajanların salınımından sorumlu olmakla birlikte aynı zamanda fibrozisi engelleyen enzimler olarak bilinen elastaz ve kollejenazların salınımını da yaparlar. Bu nedenle düzgün ve dengeli doku

iyileşmesinde makrofajların rolü önemlidir. Kronik inflamasyon gelişiminde rol alan diğer hücre grubu ise lenfositlerdir. Lenfositler sitokinler salgılayarak monosit ve makrofajları aktive ederler. Kronik inflamasyonu akut inflamasyondan ayıran fark doku yıkımı ve fibrozistir. Fibroziste olay fibroblast proliferasyonu ve fazla ekstrasellüler matriks toplanmasıyla birlikte organ fonksiyon bozukluğunun gelişmesidir (61, 62, 64). Bu süreçte kollajen sentezi ve depolanması yara iyileşmesinin bir diğer aşamasını oluşturur. Skar oluşumunun temel yapısını oluşturan kollajen tüm dokuların ana yapısal proteindir ve üç polipeptid sarmalından oluşur. Tip I, Tip III, Tip V fibriler yapıda olup ekstrasellüler matrikste bulunurken Tip IV fibrilsiz olup bazal membranlarda bulunur. İnterlökin-2 (IL-2) ve TGF- β ile kollajen sentezi artırılabilir (24). Kollajen miktarı ile yaranın direnci ve skarlaşması doğrudan ilişkilidir. Yaralanmanın 36-72 saati içinde mezenşimal hücrelerin farklılaşmasından fibroblastlar meydana gelirler (25, 29, 30). Kollajen fibroblastlar tarafından üç ile beşinci günlerinde üreilmeye başlar ve yapım ve yıkımını dengeli bir şekilde devam eder. Bu dengedeki amaç bağ dokunun yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünü sağlamaktır. Kollojenaz nötrofil, makrofaj ve fibroblastlar tarafından salınan bir metalloproteinazdır. Kollajenin üçlü sarmal yapısını bozarak parçalanmaya uygun hale getirir. Kollojenaz doku yeniden modellenmesi için gereklidir. Ekstrasellüler matriksi bir arada tutan ve hücrelere bağlayan fibronektin, laminin, trombospondin, tenasin isimli yapılar adheziv glikoproteinlerdendir. Fibronektin fibroblastlar, monositler, endotel hücrelerince yapılır ve çok sayıda ekstrasellüler matriks komponentini (kollajen, fibrin, heparin, proteoglikan) birbirine bağlar. İntegrinler diğer reseptörler aracılığıyla hücrelerle bağ kurarak hücre hareketini ve farklılaşmasını uyarır (25). Laminin bazal membranlarda bulunur ve hem hücrelere hem de tip IV kollajene ve heparan sülfata bağlanan bir proteindir. Görevi hücre büyümesi, farklılaşması ve hareketini sağlamaktır. Yara iyileşmesinde iyileşen doku eski sağlamlığının %80' ine kadar ulaşabilir ve bu sağlamlık en az altı ayda oluşur. Kollajen yapımının artmasına paralel olarak yara direnci artar. Granülasyon dokusunda ilk biriken kollajen tip III' dür. Daha sonra yerini tip I kollajene (yetişkin doku kollajeni) bırakır (54).

2.3.1. *Hipertrofik Skar*

Hipertrofik skarlar aşırı skar oluşumunun klinikteki türüdür. Normal skarlarda bulunan bir negatif geri besleme mekanizması fibroblastların aşırı çoğalmasını engellemektedir. Bronson, matür skarlardan elde edilen fibroblastların normal yara iyileşmesinde fibroblast proliferasyonunu baskılayabildiğini göstermiştir (10). Bu negatif geri besleme mekanizmasının çalışmaması hipertrofik skarlarda abartılı yara iyileşmesini açıklayabilir. Hipertrofik skarlar genelde yara bölgesinin sınırları içinde kalırlar. Normal dokuyu etrafa doğru iterek büyüseler de yara etrafındaki normal dokuyu invaze etmezler ve zamanla regresyon gösterebilirler (6, 88). Hipertrofik skarların tedavisi için sıklıkla cerrahi eksizyon ve sonrasında steroid ve/veya silikon tabaka uygulaması kullanılır. Bu tedavi sonrasında skarlarda rekürrens nadirdir (81). Hipertrofik skarlar için pek çok risk faktörü ortaya atılmış olsa da etyolojisinde şu ana kadar açıkça ortaya konmuş tek önemli risk faktörü ailesel yatkınlıktır. Hipertrofik skarlar normal skar dokusundan histolojik olarak gözlenebilen zengin damarlanmaları, yüksek mezankimal hücre yoğunlukları, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ile ayrılırlar. Bu lezyonlar fibroblastik hücreler, oklüde küçük damarlar ve rastgele organize olmuş ince kollajen fiberlerden oluşan nodüler yapılar şeklinde görülürler. Hipertrofik skar nedenleri özetle aşağıda sıralanmıştır:

- *Anormal Fibroblast Aktivitesi:* Hipertrofik skarlarda bulunan fibroblastların bazal kollajen üretim düzeyinde orta dereceli bir artış vardır. Ancak büyüme faktörlerine olan yanıtlar normal fibroblastlara benzerdir (11)
- *Büyüme Faktörleri ve Diğer Sitokin Düzeylerinde Artma:* VEGF, TGF- β 1/ β 2, PDGF.
- *Apoptoziste Azalma:* Apoptozis embriyogenezde dokuların şekillenmesinde ve hücre yenilenmesinde önemli rol oynamaktadır. Çalışmalar apoptozis sürecinin yara olgunlaşmasında da önemli rol oynadığını göstermektedir. P53 geninin hipertrofik skarlardaki fibroblastlarca normal skarlara göre daha yüksek miktarda üretildiği

gösterilmiştir. Bu durum, artmış kollajen sentezine karşı apoptozisin artması şeklinde bir yanıt olarak düşünülmüştür (50).

- *Plazminojen Aktivatör İnhibitörü-1 Düzeyinde Artma*: Fibrin yara iyileşmesindeki inflamatuvar hücre migrasyonunda, kollajen sentezinde ve granülasyon dokusunun oluşumunda önemli rol oynar. Plazmin tarafından parçalanır. Plazmin düzeyleri ürokinaz ve plazminojen aktivatör tarafından arttırılırken plazminojen aktivatör inhibitörü-1 ile azaltılır (92).

2.4. Peridural fibrozis ve bu fibrozisi önlemede kullanılan bazı metotlar

2.4.1. Peridural fibrozis

Spinal cerrahi sonrası postoperatif en önemli komplikasyonlardan birisi peridural fibrozistir (67). Çeşitli serilerde %20-47 arasında değişen oranlarda peridural fibrozis geliştiği bildirilmiştir (83). Postoperatif MR görüntüleme bulguları ve klinik izlem sonuçları peridural fibrozis ile postoperatif ağrı arasında önemli bir ilişki olduğunu göstermiştir (32). Peridural fibrozisin paravertebral kasların derin yüzeyinde ve periostun fibroz tabakasında oluşan yoğun fibrotik doku ile postoperatif hematoma invazyonu sonucu oluştuğu düşünülmektedir. Fibroblastlar spinöz çıkıntı ve laminadan uzaklaştırılan kas dokusundan köken alırlar. Spinal kanal cerrahi olarak açıldığında ve ligamentum flavum çıkarıldığında fibroblastlar peridural boşluğa dolarlar. Bu hücreler tarafından oluşturulan bu fibrotik dokunun oluşumu, spinöz çıkıntı ve laminadaki paravertebral kasların iyileşmesi için gereklidir. Bu doku nöral kanal içine uzanabilir ve dura mater ile sinir köküne de yapışabilir. Gelişen fibrotik doku sinir kökünü çekerek, gererek ya da kök üzerine bası yaparak radiküler ağrıya neden olur (32, 34, 44, 89). Bu fizyolojik skar dokusunun operasyondaki teknik hatalardan, peridural yağ dokusundaki yıkımdan, keloid reaksiyondan, spinal kanalın omurga erektör kasları tarafından invazyonundan ve hematoma fibrotik reaksiyonu tetiklemesinden kaynaklandığı düşünülmüş; bunların sonucu oluşan hipertrofik ve çevreleyici membran, Larocca ve Macnab tarafından "*postlaminektomi membran*" olarak tanımlanmıştır. Bu membran omurga cerrahisi sonrası bazı hastaların prognozunu kötü

etkileyen siyatik irritasyon ve lomber ağrının nedenlerinden biri olarak kabul edilmiştir (15, 33, 43, 71, 89, 96). Anulus fibrozisin etkilenmesinin skar dokusu oluşumunda önemli bir rol oynadığı da öne sürülmüştür. Nachemson ve ark rüptüre olmuş intervertebral diskten protein kaçağının skar oluşumunda bir neden olabileceğini ileri sürmüşlerdir (34). Bazı araştırmacılar ise peridural mesafeye uygulanan cerrahi müdahalenin bölgeye gelen fibroblastların sebep olduğu kollajen depozitlerinin birikimiyle sonuçlanan inflamatuvar reaksiyondan sorumlu olduğunu, oluşan fibrotik dokunun hemoraji ve infeksiyon gibi cerrahi komplikasyonların da sonucu olabileceğini bildirmişlerdir. Benoist ve ark lomber disk hernisi nedeniyle opere edildikten sonra ağrıları geçmeyen ve tekrar opere edilen 38 olguya dayanarak yaptıkları çalışmada ikinci operasyon sırasında hastaların tümünde belirgin peridural fibrozis dışında patolojik bir durumun olmadığını ve 3 olguda araknoiditis saptandığını bildirmişlerdir (7). Fokal spinal araknoiditin etyolojisinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise nükleus pulpozusun araknoitte ve peridural mesafede belirgin fibrozis yaptığı ve bunun da peridural mesafeye sızan nükleus pulpozusun yarattığı inflamasyona bağlı olduğu bildirilmiştir. Bazı araştırmacılar ise peridural fibrozisin ve araknoiditin etyolojisinde operasyon bölgesinde kalan pamuk fibrillerin rol oynadığını bildirmişlerdir (36, 38, 39).

Skar dokusu ile nüks disk hernisinin ayırımı önemlidir. Çünkü skar dokusu için yapılan reoperasyonlarda sonuçlar pek yüz güldürücü değildir. Kontrast uygulanarak elde edilen radyolojik görüntülemelerde nüks disk hernisi avasküler iken ve sadece nüks disk çevresinde kontrast tutulumu varken skar dokusunda homojen opak madde tutulumu olur (14). Lomber disk hernisi cerrahisi sonrası ağrıları geçmeyen hastalarda eğer tekrarlayan bir disk protrüzyonu veya tanımlanabilen bir kök sıkışması yok ise en önemli sebebin peridural fibrozis olabileceği (38) ve sinir kökleri etrafındaki fibrotik dokunun operasyondan sonraki bulguların sebebi olabileceği öne sürülmüştür (40)

Peridural skar dokusu cerrah için iatrojenik instabilite, dural yırtık ve sinir kök yaralanması gibi komplikasyon risklerini artıran, cerrahi diseksiyon için daha fazla zaman

gerektiren ve cerrahi girişimi zorlaştıran bir durumdur (89). Jönsson ve ark inatçı veya tekrarlayan bel ve bacak ağrısı olan ve daha önce opere edilmiş olan 93 hastayı tekrar opere ettiklerinde 19 hastada disk herniasyonu, 19 hastada lateral spinal stenoz, 20 hastada santral stenoz ve 35 hastada periradiküler fibrozis saptamışlardır. Peridural fibrozis nedeni ile opere edilen olgularda başarı oranının %30-37 arasında değişmekte olduğunu, olguların %10-20'sinde ise kötüleşme olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca tekrarlayan disk hernisi ve darlık sebebi ile opere edilen hastalarda iyi sonuçlar elde ederken sinir kökündeki skar sebebi ile opere edilen hastalarda aynı neticeleri elde edemediklerini bildirmişlerdir (42). Fager ve ark yaptıkları çalışmada tekrar opere edilen hastaların %1'inde düzelme olduğunu, %34'ünde değişiklik olmadığını ve %25'inde ise semptomların daha kötüleştiğini bulmuşlardır (28)

Peridural fibrozisi azaltmak için cerrahi teknikler ve çeşitli tedaviler literatürde tartışılmıştır. Daha küçük insizyonla minimal invaziv cerrahi ve kas diseksiyonunun, cerrahi esnasında kısıtlı manüplasyonların ve uygun hemostazın peridural fibrozisin miktarını azalttığı belirtilmiştir. Eldivenlerdeki pudra ve pamuk liflerin peridural alanda daha fazla reaksiyon yaptığı gösterilmiştir. Bu nedenle yabancı materyal ve toksinlerin peridural bölgenin lavajıyla uzaklaştırılması fibrozis oluşumunu azaltmaktadır. Literatürde hemostatik ajanlar ve antiinflamatuvar ilaçların kullanımı ile dokular ve dura arasına yerleştirilen mekanik bariyerler, sentetik ve biyolojik materyallerin kullanımı, peridural bölgenin CO₂ lazerle diseksiyonu ve cerrahi tekniklerin değişimi ile peridural fibrozisin azaldığı belirtilmiştir. Yağ greftleri lomber diskektomi sonrası peridural fibrozisin önlenmesinde ilk tedavi olarak uygulanmıştır. Yağ greftleri cerrahi insizyon bölgesinde subkutanöz olarak elde edilmiş ve duranın üzerine durayı kapatacak şekilde yerleştirilmiştir. Bu yağ greftlerinin dural adezyonları azalttığı ancak peridural fibrozisi önleyici etkisi olmadığı hatta cauda equina sendromuna neden olabildiği belirtilmiştir. Denenen dura bariyerlerinin bir kaçışunlardır: gelfoam, silastik, zenoderm, dacron, vicryl mesh, oxiplex, karboksimetilselülöz, biyolojik yıkılabilir polimerler, biyoelastik polimerler, polietilen oxide, gore-tex membran,

seprafilm membran ve ADCON-L, sodyum hyaluronat. Denenen farmakolojik ajanlar ise başlıca şunlardır: steroidler, mitomisin-C, aprotinin, interferon-gamma, tacrolimus, rekombinant plasminojen aktivatörleri, antineoplastik ajanlar (5-florourasil, metotreksat), immunosupresif ajanlar (siklosporin-a), antioksidan ajanlar (alfa-lipoik asit) ve antiinflamatuvar ilaç tedavileridir. Bunların kullanımını hayvan modellerinde başarılı bir şekilde gösterildiği halde klinikte kullanımında henüz yeterli başarı sağlanamamıştır (3, 12, 34, 44, 75, 89, 98).

2.4.2. Peridural fibrozisi önlemede kullanılan bazı metotlar

2.4.2.1. Steroidler ve steroid olmayan antiinflamatuvar (NSAI) ilaçlar:

Çeşitli faktörlerin etkisiyle aktive olan fosfolipaz A2 membran fosfolipitlerini hidroliz ederek *araşidonik asit* salınımını sağlar. Araşidonik asit *siklooksijenaz(COX)* ve *lipooksijenaz* enzimleri ile sırasıyla prostanoidleri ve lökotrienleri (LT) meydana getirir. Prostanoidlerden sentaz enzimi aracılığı ile prostaglandin endoperoksit (PGG₂) sentezlenir. Bu ise daha sonra peroksidaz etkisi ile PGH₂' ye ve o da diğer prostanoidlere (prostasiklin=PGI₂) ve trombositlerde tromboksanlara (TXA) dönüşür. PGI₂ trombosit adhezyonunu ve agregasyonun önler, kuvvetli bir vazodilatör ve bronkodilatördür, böbreklerden idrar atımını artırır ve periferik sinir uçları kaynaklı hiperaljeziye neden olur. Oysa TXA₂ trombositlerin adhezyonunu ve agregasyonunu artırır, vazokonstrüktör ve bronkokonstrüktör etkilere sahiptir (93). Siklooksijenazın *konstitütif* tip (COX-1) ve *induklenebilir* tip (COX-2) olmak üzere iki tipi vardır. COX-1 enzimi dokularda hemostazdan sorumlu iken COX-2 daha çok sitokinler, büyüme faktörleri, tümör nekrozis faktör (TNF) gibi proinflamatuvar stimulanlar tarafından uyarılır ve bu enzim ürünü olan prostanoidler ateş, kızarıklık, şişlik, ağrı ve fonksiyon kaybı gibi inflamasyon semptomlarının açığa çıkmasına aracılık ederler (86). Öte yandan aktive olmuş nötrofillerden ve makrofajlardan da COX-2 enzimi eksprese olur ve bu da COX-2 enzim seviyesinin artmasına katkıda bulunur. (4)

Steroid kökenli ilaçlar hem siklooksijenaz ve hem de lipooksijenaz yolları üzerinde inhibitör etkiye sahiptir. Bu ilaçların yüksek dozlarda lokal ya da sistemik kullanımı sonrası yara yerinde fibrotik doku oluşumunun azaldığı tespit edilmiştir. Ancak daha sonraki dönemlerde yara tensil güçlerinde azalma olduğu ve yara yerinde infeksiyon riskinin arttığı tespit edilmiş ve bu yöntem uygulama dışı kalmıştır (82).

NSAI ilaçlar siklooksijenaz yolağının inhibisyonu üzerinden etkilerini ortaya koyarlar. Bu ilaçlar cerrahi sonrası hem analjezik etkileri ile yaradan kaynaklanan ağrıyı azaltırlar ve hem de yaradan açığa çıkan prostaglandinlerin ve/ veya lökotrienlerin sentezini azaltarak ya da inhibe ederek kapiller permeabiliteyi, kemoatraksiyonu, inflamatuvar hücre infiltrasyonunu, fibroblastik hiperplaziyi ve granülasyon dokusunun oluşumunu baskırlar. Ayrıca bu ilaçlar hem sistemik ve hem de lokal uygulanmaları mümkündür ve yabancı cisim reaksiyonu, yer işgal edici kitle etkisi, virion benzeri infeksiyon taşıma riski gibi özellikleri de yoktur. Bu özellikleri sayesinde de bariyerlere karşı bir üstünlük taşırlar (80). Ancak bu ilaçların yara yerindeki iyileşmeyi azaltmaları ve yara gerilme güçlerini azaltmaları sonrası yara kenarlarının yapışmayıp ayrılması en önemli dezavantajlarıdır (2).

2.4.2.2. *ADCON-L*

İlk kez Frederickson ve ark proteoglikan ve benzeri moleküllerin fibroblast göçüne karşı bir bariyer oluşturabileceğini savunmuşlardır. Daha sonra “GT-1857” ve “GL-402” gibi karbonhidrat polimerlerin skar oluşumunu ve kemik büyümesini önlediği gösterilmiştir (78). *ADCON-L*, en son geliştirilen karbonhidrat polimeridir. *ADCON-L* domuz kökenli jelatin ve poliglikan karbonhidrat içerikli bir polimerdir ve yara ortamında fiziksel bariyer oluşturarak fibroblast göçünü engellediği hayvan deneylerinde gösterilmiştir (24). *ADCON-L*'nin önemli avantajlarından biri jel kıvamında olup kolay uygulanabilmesi ve disk bölgesinden laminektomi sahasına kadar olan operasyon bölgesindeki boşluğu rahatlıkla doldurabilmesi ve bu bölgedeki fibrozis gelişimini azaltmasıdır (21, 76). Bugün *ADCON-L* peridural fibrozis tedavisinde bazı merkezlerde rutin olarak kullanılmaktadır. *Adcon-L*

yaklaşık 4 hafta içinde uygulama yapılan doku alanından resorbe olmaktadır. Deneysel ve klinik çalışmalarda bu anti-adezyon bariyer jelin peridural fibrozisi anlamlı biçimde azalttığı gösterilmiştir (76, 79).

2.4.2.3. *Hyaluronik asit*

Hyaluronan eskiden beri ekstrasellüler matriksin yapı taşlarından birisi olarak bilinir ve yapısal olarak D-glukoronik asit ve N-asetil glukozamin tekrarlayan dizilerinden oluşur. Yetişkinlerde eklem yüzey kıkırdaklarında yoğun miktarda bulunur ve kayganlık verici ve eklem ve yumuşak doku koruyucu özellikleri vardır. Fetal dokularda erişkin insan dokusundan farklı olarak büyüme faktörlerinin ve hyaluronidaz enzimin düşük değerleri ve hyaluronanın yüksek oranları nedeni ile yaralanma sonrası skar dokusu oluşmaz ve yaralanmış olan fetal dokuda yara nedbesiz iyileşir. Diğer yandan yaralanma sonrası ECM’ de yerleşik olan hyaluronan oksidasyon mekanizmaları ya da enzimler (hyaluronidaz, heksozaminidaz, kondroitinaz gibi) nedeni ile depolimerize olur ve daha düşük molekül ağırlıklı polimerlere (oligomer) dönüşür. Bu oligomerler ise yaralı dokuya hücre migrasyonunu ve hücresel çoğalmayı indükler ve bu durum da yaranın nedbe ile iyileşmesine neden olur (82).

Hyaluronik asitin yara iyileşme sürecinde hücresel ve ekstrasellüler matrikse dair olaylarda çok yönlü görevleri olduğu bilinmektedir. Yara iyileşmesinin erken inflamasyon fazında yara dokusu hyaluronik asitten zengindir ve erken inflamasyonun bir uyarıcısı olarak görev yapmaktadır. TNF- α , IL-1 β ve bakteriyel liposakkaridler gibi inflamatuvar sitokinlere cevap olarak mikrovasküler endotel hücrelerinin hyaluronik asit sentezlediği gösterilmiştir. Büyük damar endotel hücrelerinde bu özelliğe rastlanmamıştır. Biraz tartışmalı olan rolü de granülasyon doku matriksinin stabilizasyonuna katkıda bulunduğu ve yara matriksine hücre migrasyonunu kolaylaştırdığı bilinmektedir (18, 41, 57, 74). Plazma membranından sentezlenen ve ekstrasellüler bölgeye doğrudan salgılanan hyaluronik asitin hücre migrasyonu ile korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. Burada erken granülasyon dokusunun bir

özelliği olan “hyaluronik asitten zengin ECM’ den oluşan öncül yara matriksi” hücre migrasyonunun oluşması için uygun bir çevre oluşturmakta, hyaluronik asit fizikokimyasal özellikleri ile hücrelerle doğrudan etkileşerek hücre migrasyonunu kolaylaştıran açık hidrate bir matriks sağlamaktadır. Hücre etkileşimi yoluyla ise hyaluronik asit hücre lökomotor mekanizmalarının kontrolunu sağlamaktadır. Buna paralel olarak hyaluronik asit yıkımı ya da hyaluronik asit reseptör blokajı ile hücre hareketlerinin kısmen inhibe edildiği de gösterilmiştir (18, 41).

İnflamasyon-stimulasyon fonksiyonuna ek olarak hyaluronik asitin inflamasyon düzenleyici fonksiyonu da vardır. Hyaluronik asit hasarlı ortamdaki hücreleri serbest radikal hasarına karşı korumaktadır. Büyük poliyonik polimerlerin fizikokimyasal özelliği olarak serbest radikal yakalayıcı özelliği ile bunu gerçekleştirebilmektedir. Farelerdeki serbest radikalle indüklenen inflamasyon modelinde hyaluronik asitin granülasyon dokusundaki hasarı azalttığı gösterilmiştir. Serbest radikal yakalayıcı rolüne ek olarak inflamasyonun biyolojik maddeleriyle olan spesifik etkileşimler yoluyla da hyaluronik asit inflamatuvar aktivasyonda negatif feedback olarak görev yapmaktadır. İnflamasyonda üretilen en önemli sitokin olan TNF- α , fibroblast ve inflamatuvar hücrelerde TSG-6 ekspresyonunu uyarmaktadır. Hyaluronik asit bağlayan protein olan TSG-6, serum proteaz inhibitör “IAI” ile stabil bir kompleks oluşturarak plazmin inhibitör aktivitelere sinerjistik etki yapar. Buna göre ECM’ de hyaluronik asite bağlanan TSG-6-IAI kompleksinin etkisi inflamasyonu hafifleten negatif feedback yaratmak ve iyileşme sürecinde granülasyon dokusunu stabilize etmek olarak yorumlanmaktadır (18, 41, 57).

Diğer yandan ECM’ deki yüksek moleköl ağırlıklı hyaluronik asitin anjigenezi inhibe ettiği de gösterilmiştir. Buna karşılık düşük moleköl ağırlıklı hyaluronik asit-oligosakkarit kompleks moleküllerinin anjigenezi uyardığı ve endotel hücreleri tarafından kollajen üretimini arttırdığı da gösterilmiştir. Bu kompleks moleküllerin endotel hücre fonksiyonunu ICAM-1 reseptörüne bağlanarak düzenleyebilme ve makrofajlardaki CD44 reseptörüne bağlanarak TNF- α ve IL-1 β gibi çok sayıda genin ekspresyonu indükleyebilme

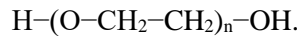
özellikleri de vardır. Bu da ICAM-1 reseptörlerinin artışına ve ardından endotel hücrelerinin stimülasyonuna yol açabilmektedir. Diğer yandan yüksek molekül ağırlıklı hyaluronik asit de bu reseptörlere bağlanabilmektedir ancak bu durumda nasıl farklı etkiler yarattığı henüz bilinmemektedir. Bununla birlikte çeşitli *in vivo* sistemlerde hyaluronidaz artışı ve matriks hyaluronik asitinin yıkımı anjiogenezle eş zamanlı gözlenmekte; bu durum hyaluronik asit-oligosakkarit kompleks moleküllerinin anjiogenezin kontrolünde fiziksel bir role sahip olduğu hipotezine destek sağlamaktadır (18, 41, 90).

Serbest radikal yakalama fonksiyonu ve keratinosit proliferasyonu ve migrasyonundaki rolü hyaluronik asitin reepitelizasyon sürecinde de görev aldığını düşündürmektedir. Epidermin bazal tabakasında CD44 ve hyaluronik asit birlikte bulunmaktadır. Hyaluronik asitin epidermiste primer fonksiyonu ekstrasellüler alanı sürdürerek besinlerin geçişi için açık ve hidrate bir alan oluşturmaktır. Epidermal hyaluronik asit normal epidermis fonksiyonu ve doku onarımında gerekli olan keratinosit proliferasyonunun kontrolünde de etkilidir. İyileşen yaralarda hyaluronik asit yara kenarındaki bağ doku matriksinde ve yaraya geçen keratinositlerde eksprese edilmekte, bu ise doku onarımı ve deri fizyolojisinde hyaluronik asitin ve CD44' ün önemli rolleri olduğu fikrini desteklemektedir (18, 41, 90)

2.4.3. Peridural fibrozisi önlemede faydalı olabilecek biyofiziksel bariyerler

2.4.3.1. Polietilen glikol (PEG)

Polietilen glikol (PEG) sentetik bir polieter olup çeşitli moleküler ağırlıklara sahiptir. Kısa moleküler tanımı aşağıdadır:



Moleküler ağırlığı <100.000 olduğunda PEG adını alırken bu değerin üzerindeki moleküllere polietilen oksit (PEO) adı verilmektedir. Düşük molekül ağırlıklı PEG visköz ve renksiz bir sıvı iken yüksek molekül ağırlıklı PEO macun kıvamında beyaz katı bir polimerdir ve erime derecesi 67 °C civarındadır. PEG amfibiik karakterde olup suda ve organik çözücülerde

(metilen klorit, etanol, toluen, aseton, kloroform gibi) kolayca çözünebilmektedir. PEG inert ve toksik olmayan bir madde olup yüksek çözünürlük özelliği nedeni ile bir çok değişik farmasötik formulasyonlarda, yiyecek sektöründe ve kozmetik kimyada taşıyıcı olarak kullanılmaktadır. Çok düşük molekül ağırlıklı PEG polimerler ise vücuttan hızla yıkılıp uzaklaştırılabildiği için vücutta ilaç taşıma/ dağıtma, doku mühendisliği, yüzey fonksiyonallasyonu ve diğer birçok uygulamada kullanılabilir (59). Daha önce yapılan biyouyumluluk çalışmalarında PEG' in bariyer olma özelliği ile inflamatuvar hücre göçünü engellediği ve uzun süre yaralı ortamda kalma özelliği sayesinde fibrozis gelişimini azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca bu polimerin toksisite özelliği çok az inert bir madde olma özelliği sayesinde dokudan uzaklaştırılması sırasında fibroblastik aktiviteye maruz kalmadan makrofajlar tarafından yıkıma uğraması ve ortamdan uzaklaştırılması da bu maddenin yara iyileşmesinde avantajlı yanlarının birisi olmaktadır. Tüm bu özellikleri göz önünde bulundurularak yapılan deneysel ve klinik çalışmalarda PEG' in yara iyileşmesinde skar oluşumunu engelleyebildiği gösterilmiş ve akciğer dokusunda hava kaçaklarını, vasküler yaralanmaların onarımı sonrası kan kaçaklarını, intra-abdominal ve intra-pelvik cerrahilerde yapışıklıkları önlediği gösterilmiş ve etkinliği ispatlanmıştır. Ayrıca PEG bir dural bariyer olarak ta klinikte dural beyin-omurilik sıvısı kaçaklarını önlemek üzere sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (72, 73). Yapılan bir deneysel çalışmada lomber laminektomi sonrası dura cerrahi olarak açılıp sütüre edilmiş ve sonrasında bir grup denek kontrol amaçlı bırakılıp diğer gruba PEG uygulanmıştır. Deneyin sonunda PEG' in hem BOS kaçaklarını engellemede ve hem de peridural fibrozis oluşumunu azaltmada başarılı olabildiği gösterilmiştir. Bu çalışmada PEG uygulanan deneklerin peridural mesafesinde fibroblastik aktivitenin oluşmadığı, yeni dura oluşumunun engellenmediği gösterilmiş ve ortamda bulunan makrofajların ise sadece PEG yıkımı için orada olduğu yazarlar tarafından düşünülmüştür. Ayrıca subdural mesafede gelişen yapışıklıkların ise kontrol grubu ile benzer olduğu gösterilmiş ve çalışma sonunda PEG' in subdural mesafede inert madde olması

nedeni ile inflamatuvar reaksiyona neden olmadığı öne sürülmüştür. Ancak bu çalışmada ileri düzey histopatolojik ve moleküler analizler uygulanmamıştır (73).

2.4.3.2. Trombositten zengin plazma (platelet rich plasma, PRP)

Trombositler kemik iliğindeki megakaryoist hücelerden köken alan ovaloid karakterde sitoplazmik fragmanlardır. Trilaminar hücre membranları olup üzerlerinde reseptörler taşırlar. Bu fragmanların içinde çekirdek olmamakla birlikte mitokondri gibi hücre organelleri ve granüller (α , β ve γ gibi) bulunmaktadır. Trombositlerin granüllerinde yara iyileşmesine yönelik çok fazla sayıda büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokinler vardır. Bu maddeler trombositler aktive olduğunda granüllerinden ortama salınır ve yara iyileşmesinin migrasyon, proliferasyon, farklılaşma ve matriks sentezi aşamalarını başlatırlar. Örneğin PDGF makrofajlar için kemotaktik özellik taşıırken PDGF, TGF- β ve insulin benzeri büyüme faktörü (Insulin Like Growth Factor=IGF) mezenşimal hücrelerin, kök hücrelerin ve osteoblastların mitojenitesinde ve kemotaksisinde, kollajen sentezinde, neovaskülarizasyonda ve kemik matriks oluşumunda kollektif görevler alırlar (27).

Trombositlerin granüllerinden salınan bu maddelerden bazıları şunlardır:

Kemokinler, sitokinler ve diğerleri: Interlökin-1 (IL-1), IL-8, Kemokinler: (CCL2, CCL3, CCL5, CCL7, CCL17, CXCL1, CXCL2, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL8, CXCL12), “Pro-platelet basic protein”, “neutrophil activating protein-2”, “Angiopoietin-1”, “Endostatin”, “Osteonectin”, “Osteocalcin”.

Bu kemokin ve sitokinler damarlanma artışını (anjyogenez), kemotaksisi, vasküler remodelizasyonu, hücreler arası etkileşimi ve kemik oluşumunu düzenlerler. Özellikle angiostatin, endostatin ve TIMP grubu enzimler antianjyogenez etkisi gösterirler.

Büyüme ve mitotik faktörler: PDGF, TGF- β 1 ve β 2 izomer, EGF, IGF, VEGF, FGF-2, Epitelyal hücre büyüme faktörü (Epithelial cell growth factor=ECGF), Trombosit kökenli anjyogenez faktörü (Platelet-derived angiogenesis factor=PDAF), Kemik morfogenetik protein (Bone morphogenetic protein-2, -4, -6=BMP-2, -4, -6).

Bu büyüme faktörleri kemotaksisten, hücre çoğalmasından, hücre farklılaşmasından ve anjiyogenezden sorumludurlar. Özellikle aktive trombositlerden salınan CD40L ile CD40 etkileşimi sonrası yukarıda bazıları sıralanan büyüme faktörleri yaralı doku ortamına salınır ve bunlar yaralı dokuya kan ürünleri ve oksijen taşıyacak olan yeni damarların oluşumunu (anjiyogenez) başlatırlar. Burada VEGF anjiyogenezi ve inflamatuvar hücrelerin endotelial geçişini ve yaralı ortama ulaşmalarını artırırken TGF- β 1 anti-anjiyogenez etkiye sahip olup MMP enzimlerini uyarır.

Proteazlar ve antiproteazlar: MMP-1, MMP -2, MMP -4, MMP -9, “A disintegrin and metalloprotease with a thrombospondin motif 13” (ADAMTS13), “A disintegrin and metalloprotease motif 10 ve -17” (ADAMS10 ve -17), TIMP-1, TIMP -4, C1 inhibitör, α 1-antitripsin.

Bu maddeler anjiyogenez, vasküler remodelizasyon, koagülasyonun düzenlenmesi ve hücre davranışlarının düzenlenmesinden sorumludurlar. MMP grubu enzimler embriyonik gelişimde, hücre migrasyonunda, yara iyileşmesinde, doku remodelizasyonunda görevli proteinlerdir. Ayrıca bunlar tümör gelişiminde, aterosklerozda ve hematopoietik kök hücre mobilizasyonunda da görevlidirler. Bu enzimlerin etkileri TIMP tarafından inhibe edilmektedir. Her ikisi de yara iyileşmesi ve inflamasyonda düzenleyici görevler alırlar.

Yapışkan (adhesive) proteinler:“von Willebrand factor”, “Fibrinogen”, “Fibronectin”, “Vitronectin”,“Thrombospondin-1”, “Laminin-8”

Bu proteinlerin hücrelerin temas ve etkileşiminde, hemostazda ve pıhtılaşmada, ekstrasellüler matriksin oluşturulmasında görevleri vardır.

Pıhtılaşma faktörleri ve bunların inhibitörleri: Faktör V/Va, Faktör XI, Multimerin, Protein S, Kininojen, Proteaz neksin-1 ve-2, Protein C inhibitör,

Bu faktörler trombin yapımı, pıhtılaşma ve hücre çoğalmasında sorumludur (68). Trombositler yaralı dokuda ilk bir saat içinde α -granüllerindeki tüm içeriği yara ortamına boşaltırlar.

PRP otolog kandan elde edilen fraksiyone edilmiş plazma içerikli bir kan ürünü olup içeriğinde kandakinin 3-5 katı kadar daha fazla oranda trombosit ve tüm pıhtılaşma faktörleri, bir miktar lökosit ve lenfosit bulundurur. Bu ürün klinikte yara iyileşmesi ve rejenerasyonunda (kemik, kırık, visseral organ yaralanmaları gibi) yeni kullanılmaya başlanmış bir üründür. Bu malzemenin alt tipleri olup klinikte çoğunlukla saf PRP ya da lökosit ve trombosit zengin L-PRP kullanılmaktadır. Bu plazmanın kullanımında amaç içeriğinde bulunan ve yukarıda tarif edilen büyüme faktörlerini yara iyileşmesinde kullanılmak üzere normal kandan daha yüksek konsantrasyonlarda yara ortamına bırakabilmektir (65). Klinik uygulamalarda PRP halen periodontal ve oral, maksillofasial, estetik, plastik, spinal füzyon, kalp by-pass cerrahilerinde ve kronik cilt ve yumuşak doku ülserlerinde başarı ile kullanılmaktadır (27).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Çalışmanın tamamı Kırıkkale Üniversitesi Etik Kurulu tarafından deneysel araştırmalar için belirlenen kurallar ve prosedürler doğrultusunda, gerekli onay alındıktan sonra yürütüldü (Karar tarihi: 09.01.2014 ve karar numarası: 14/ 16). Ayrıca bu tez çalışması Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından finansal açıdan desteklendi (BAP Proje Numarası: 2014/ 75)

Bu deneysel araştırmada üç adet deneysel farmakolojik ajan test edildi. Bu farmakolojik ajanlar aşağıda ayrıntılı şekilde tarif edilmiştir:

- Hyalüronik asit dural bariyer (HAS) (Incert®-S, Anika Therapeutics SRL, Italy),
- Aktive polietilen glikol ve polietilen imine dural bariyer (PEG) (Adherus™ Dural Sealant, HyperBranch Medical Technology, Durham, NC, USA).
- Trombositten zengin plazma (PRP) (RegenACR-C, Regen Lab SA, Mont-sur-Lausanne, Switzerland)

Çalışma 300-350 gram ağırlığında ve erkek cinsiyette 42 adet Wistar Albino rat üzerinden yapıldı. Deney öncesinde deney hayvanlarının deneye alınma kriterleri deneklerin genç yaşta olması, canlı, düzgün hareketli, tüyleri düzgün ve vücut bütünlüğünün tam olması ve vücut anomalisi ve şekil bozukluğunun bulunmaması olarak belirlendi. Deney hayvanlarının deneyden çıkarılma kriterleri ise cerrahi alanda veya organizmanın başka yerinde ortaya çıkacak infeksiyon, cerrahiye sekonder sakatlık (paraparezi, parapleji), genel vücut ağırlığında azalma (yiyecek ve su alımında azalma), cerrahi alanın izlem sırasında açılması, diğer hayvanlar tarafından cerrahi alana veya diğer vücut bölgelerine zarar verilmesi (doku kaybına neden olabilecek kadar ciddi düzeyde dişlenmesi, tırnaklanması ya da yenmesi) şeklinde deney öncesinde belirlendi.

Çalışmanın başlangıcında deney hayvanları randomize şekilde altı ayrı gruba ayrıldı ve aşağıdaki şekilde isimlendirildi:

- DONÖR grubu (abdominal aortadan tüm vücut kanları toplanıp trombositten zengin plazma elde edildi; n:2)
- KONTROL grubu (hiçbir cerrahi girişim uygulanmadı ve hiçbir deneysel farmakolojik ajan verilmedi; n: 8)
- SHAM grubu (cerrahi girişim uygulandı ancak deneysel farmakolojik ajan uygulanmadı; n: 8)
- HAS grubu (cerrahi girişim uygulandı ve cerrahi alana hyaluronik asit bariyer bırakıldı; n: 8)
- PEG grubu (cerrahi girişim uygulandı ve cerrahi alana PEG bariyer bırakıldı; n: 8)
- PRP grubu (cerrahi girişim uygulandı ve cerrahi alana PRP bariyer bırakıldı; n: 8)

Sedasyon anestezi için intraperitoneal yoldan 40 mg/kg ketamine HCl (KetalarR; Pfizer Inc, USA) ve 5 mg/kg xylazine HCl (RompunR %2; Bayer HealthCare AG, Germany) kullanıldı.

3.2. Metot:

Deney hayvanlarının sedasyon anestezi uygulanması sonrası cerrahi girişim uygulanacak bölge olan sırtları traşlandı, cerrahi alanın batikon ile antisepsisi sağlandı. Takiben DONÖR ve KONTROL grubundaki denekler hariç diğer deneklere spinal korda zarar vermeden L3-L4-L5 aralığından mikroskop yardımı ile standart laminektomi prosedürü uygulandı ve spinal kord durası açığa çıkarıldı. Laminektomi sırasında dura sağlam bırakıldı ve dura altına ve spinal korda herhangi bir girişimde bulunulmadı. Cerrahi alanda hemostaz dikkatlice sağlandıktan sonra ilgili gruplara ilgili farmakolojik ajan uygulaması evresine geçildi. Bu amaçla DONÖR grubu ratlar sedasyon anestezi altında iken abdominal aortasından tüm vücut kanı enjektörler aracılığı ile alındı ve hayvana ötenazi uygulandı. Elde edilen kandan plazma kısmı ayrılıp PRP kiti ile kit kullanım prospektüsünde tarif edilen

şekilde işleme tabi tutuldu ve elde edilen materyal ilgili deney grubundaki hayvanların spinal durası üzerine ve peridural mesafesine uygun şekilde yayıldı. İlâveten hyalüronik asit dural bariyer kiti ve polietilen glikol ve polietilen imine adezyon bariyer kiti talimatlarına uygun şekilde hazırlanıp ilgili deney grubu hayvanların spinal durası üzerine ve peridural mesafesine kullanım prosedürüne uygun şekilde uygulandı (Resim 1). Takiben cerrahi katlar anatomiye uygun şekilde sütürlerle (paraspinal adeleler 4/0 vicryl ve cilt 4/0 ipek sütür ile) kapatılıp cerrahi girişime son verildi. Daha sonra ratlar sedasyon anesteziden çıkarıldı ve kendi kafeslerinde altı hafta süre ile yaşatıldı. Hayvanların kafesleri içinde 12 saat gündüz ve 12 saat gece ritminde serbest su ve yiyecek ulaşımına ve serbest dolaşımına izin verildi. Deneyin bu aşamasında SHAM grubunda 3, HAS grubunda 3, PRP grubunda 1 ve PEG grubunda 3 adet denek beklenmedik şekilde öldü. Ölen deneklerin yerine yenileri konmadı ve altı haftanın sonunda tüm hayvanlara (toplam 32 adet denek) sedasyon anestezisi altında abdominal aortadan tüm vücut kanı alımı yöntemi ile ötenazi uygulandı. Ötenazi sonrası tüm deneklerin vertebral kolonu blok halinde çıkarıldı ve cerrahi uygulanan alanlardan elde edilen dokular histopatolojik incelemeye ve polimerize zincir reaksiyon (PCR) ile gen ekspresyon analizine tabi tutuldu.

3.3. Histopatolojik inceleme

Histopatolojik incelemeler deney gruplarına ve deneysel farmakolojik ajanlara kör veteriner patolog tarafından baştan sona gerçekleştirildi. Deneysel dokular oda sıcaklığında %10 nötral tamponlanmış formalinde 24 saat süre ile fikse edildikten sonra %10 EDTA ile dekalsifiye edildi. Rutin doku takip işleminden sonra parafine gömüldü ve parafin dokulardan 5 µm kalınlığında kesitler alınıp histopatolojik inceleme için hematoksilin-eosin ve peridural fibrozisin yayılımını gösterebilmek için Massons-Trikrom boyaları (Masson-Tricrome Staining; MTS) (Bio Optica, CND Code: W01030799, Milano) ile boyandı. Tüm kesitler binoküler ışık mikroskobu (Olympus BX51; Olympus, Tokyo, Japan) ile incelenip fotoğraflandı. Gruplarda her bir preparatta laminektomi bölgesinde randomize seçilen 5 ayrı

alanda 400x büyütmenin kullanıldığı kamera (Leica CCD camera DFC420, Leica Microsystems Imaging Solutions, Ltd., Cambridge, UK) eklenmiş mikroskop (Leica DM4000 B microscope, Leica Microsystems Imaging Solutions, Ltd., Cambridge, UK) ile fibroblast sayımı yapıldı. Ayrıca peridural fibrozis düzeyi (evreleme) ve damar sayısı yine aynı kamera ve mikroskop ile değerlendirildi. Peridural fibrozis düzeyini belirlemede literatürde de kabul edilmiş olan evreleme yöntemi modifiye edilerek kullanıldı ve ayrıntıları Tablo 1’ de sunuldu (22).



Resim 1: Laminektomi sonrası omuriliğin makroskopik görünümü ve ilgili deneysel farmakolojik ajanların uygulanması sonrası omuriliğin makroskopik görünümü

Tablo1:Histopatolojik evreleme tablosu

Evre	Derece	Tanım
Evre 0-1	Normal	Dura materde fibrozis dokusu yok
Evre 2-4	Hafif	Dura mater ve fibrozis dokusu arasında ince bir fibröz bant olması
Evre 5-7	Orta	Laminektomi alanının 2/3 ünden azında aralıksız yapışma olması
Evre 8-10	Ağır	Laminektomi alanının 2/3 ünden fazlasını etkileyen büyük yapışıklıklar veya sinir köküne uzanan yapışıklık olması

3.4. “Real time PCR array” gen ekspresyon analizi

Örneklerde kollajen tip 1, kollajen tip 3, TGF-1 β , IFN- γ ve TNF- α gen ekspresyonu incelenmek üzere dokular deney aşamasına kadar -20° C’de muhafaza edildi.

İzolasyon için örnekler sıvı azot ile parçalandı ve homojenizatörde homojen hale getirilip 400 μ l lysis/binding buffer eklendi ve 15 saniye vortekslendi. Karışım filtre-koleksiyon tüpünün üst kısmına maximum 700 μ l olacak şekilde konuldu ve 15 saniye 8.000 xg de santrifüj yapıldı. Her bir örnek için 90 μ l DNase incubation buffer ve 10 μ l DNase I karıştırıldı ve 15 dakika inkübasyona bırakıldı (+15°C-+25°C). Ardından 500 μ l yıkama solüsyonu I üst rezervuara eklendi ve 8000 xg de 15 saniye santrifüj yapıldı. Elde edilen koleksiyon tekrar filtre tüpünün altına konuldu ve 500 μ l yıkama solüsyonu II üst rezervuara eklenip 8000 xg de 15saniye santrifüj yapıldı. Tekrar koleksiyon filtre tüpünün altına konuldu ve 200 μ l yıkama solüsyonu II üst rezervuara eklendi. İki dakika maksimum hızda santrifüj yapıldı ve alt rezervuara çöken sıvı dökülüp koleksiyon tüpü tekrar filtre tüpünün altına konuldu ve maksimum hızda (13000 xg) 2 dakika boş santrifüj yapıldı. Yıkama solüsyonunun tamamen uzaklaştırılması sağlanıp filtre tüpü 1.5 ml’lik ependorflara konuldu ve 50-100 μ l elution solüsyonu (örneğe göre kitin içinde değişen) üst rezervuara eklendi ve 8000 xg de 1 dakika santrifüj yapıldı. Çöken kısım RNAnın olduğu kısım olup ependorf cDNA’ya çevirene kadar -20°C’ ye konuldu. cDNA sentezi için DNA örnekleri izolasyondan sonra gerçek zamanlı PCR’ a konulurken RNA cDNA çevrildi. Çevrilme işlemi, Qubit cihazında RNA miktarına bakıldıktan sonra kit protokolüne uygun olarak yapıldı. Örnek başına kitin içindeki iki farklı primer 1 μ l olarak konuldu. Spesifik primerler kullanılmak istenildiğinde yine 1 μ l konuldu. Total RNA miktarı gerçek zamanlı PCR’ a konulurken her bir örnek için 50-100 ng mRNA düşecek şekilde hesaplandı ve cDNaya çevrilirken değişken olarak RNA maksimum 11 μ l olacak şekilde konuldu. Daha düşük miktarlar kitin içinden çıkan su ile toplamı 13 μ l olacak şekilde tamamlandı ve oluşan 13 μ l’lik karışım opsiyonel olarak 65°C’ de 10 dakika PCR’a konuldu. Çıkan örneklerin üstüne, her bir örnek için aşağıdaki malzemeler kullanıldı:

Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction buffer	4µl	1x (8 mM MgCl ₂)
Deoxynucleotide mix	2µl	1 mM (her biri)
Protector RNase Inhibitor	0.5µl	20 U
Transcriptor Reverse Transcriptase	0.5µl	10 U

Toplamda her bir örnek için 7 µl olacak şekilde karışım hazırlandı ve vorteks yapılmadan iyice pipetaj yapıldı. PCR'dan çıkan örneklerin üzerine 7 µl konuldu ve örnek toplamda 20 µl'lik bir karışım halinde PCR cihazına tekrar konuldu.

Anchored-oligo(dt) primer veya spesifik primer için	4 kb	30 dakika 55°C
hedef mRNA uzunluğuna göre	>4 kb	60 dakika 50°C
Random primer için	4 kb	10 dakika 25°C
	4 kb	30 dakika 55°C
	>4 kb	10 dakika 25°C
	>4 kb	60 dakika 50°C

Devamında; 5 dakika 85° bekletildi ve çıkan cDNA'lar buz üstüne alındı veya -20 °C'de saklandı. Real-time PCR'a hazırlık için gen ekspresyonu çalışmalarında Hydrolysis Probes Master veya SYBR Green master kullanıldı. Takiben “hydrolysis probes master PCR Mix” hazırlandı. PCR mix hazırlanırken her bir örnek için su (4µl), LightCycler 480 Probes Master (10µl), Real Time Ready Assay (1µl) toplam hacim 15 µl olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan mix vortex kullanılmadan pipetle yukarı aşağı yapılarak karıştırıldı. “LightCycler 480 multiwell plate” in her kuyucuğuna PCR miksten 15 µl, üzerine 5µl cDNA eklendi. Multiwell Plate 2 dk 1500 x g santrifüj edildi ve santrifüj işleminden sonra plate cihaza yerleştirilip kullanılacak olan MonocolorHydrolysisProbe/ UPL Probe programı seçildi. UPL Probe için gerekli protokoller cihazda seçildikten sonra LightCycler 480 PCR başlatıldı.

3.5. İstatistiksel analiz

Etik kural gereği istatistiksel analiz yapılmasına izin verebilecek minimum sayıda deney hayvanı kullanılması amaçlanmış olduğundan her gruba ait örneklem sayısı küçük tutuldu.

Çalışmadan elde edilen tüm sayısal veriler ve skorlar “Statistical Packages for the Social Science” (SPSS) 20.0 kullanılarak istatistiksel yönden analiz edildi. Tanımlayıcı istatistiksel analizler (frekans, yüzde dağılımı, ortalama±standart sapma) yapıldı.

Histopatolojik derecelendirme ve MTS derecelendirme sonuçlarının gruplar arası karşılaştırmada değerlerin normal dağılmadığı ve homojen olmadığı gözlemlendi (*Kolmogorov-Smirnov* test, $p<0.05$; *Levene's test*, $p<0.05$). Bu nedenle grupların istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında *Kruskal Wallis* testi kullanıldı ve $p<0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi. Grupların ikili karşılaştırmalarında *Mann Whitney U* testi ve *Bonferroni düzeltme* testi kullanıldı ve $p<0.005$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

Damar sayımı ve fibroblast hücre sayım sonuçlarının gruplar arasında normal dağılım gösterdiği ve homojen olduğu tespit edildi (*Kolmogorov-Smirnov* test, $p>0.05$; *Levene's test*, $p>0.05$). Bu nedenle grupların istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında *Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA)* testi kullanıldı ve $p<0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi. Grupların ikili karşılaştırmalarında *One-Way ANOVA-Tukey HSD Multiple Comparisons* testi kullanıldı ve $p<0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

PCR gen ekspresyonu analizi sonrası elde edilen kollajen-1, kollajen-3, TGF-1 β ve TNF- α gen ekspresyonu sonuçlarının gruplar arası karşılaştırılmasında değerlerin normal dağıldığı ancak homojen olmadığı gözlemlendi (*Kolmogorov-Smirnov* test, $p>0.05$; *Levene's test*, $p<0.05$). Bu nedenle grupların istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında *Kruskal Wallis* testi kullanıldı ve $p<0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi. Grupların ikili karşılaştırmalarında *Mann Whitney U* testi ve *Bonferroni düzeltme* testi kullanıldı ve $p<0.005$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

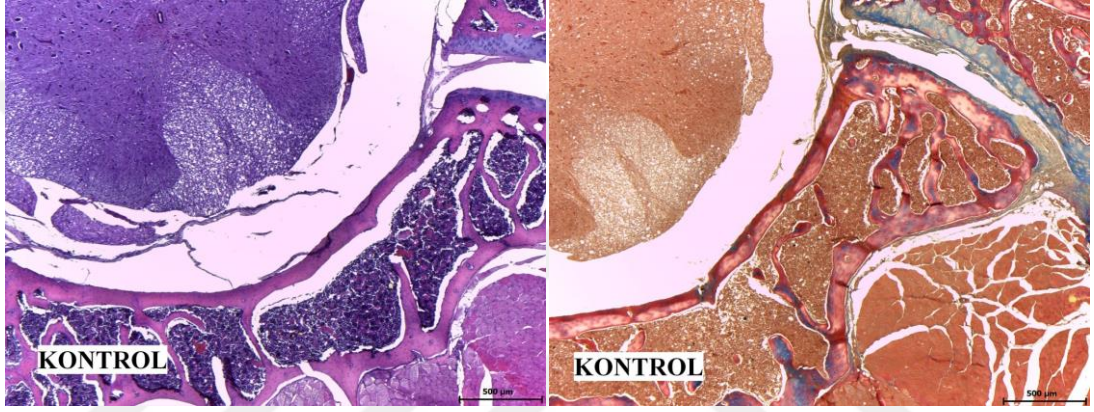
IFN- γ geni örneklerde ifade edilmediği için veri alınmadı ve istatistiksel analizde değerlendirilmedi.

4. BULGULAR

4.1. Histopatolojik Bulgular

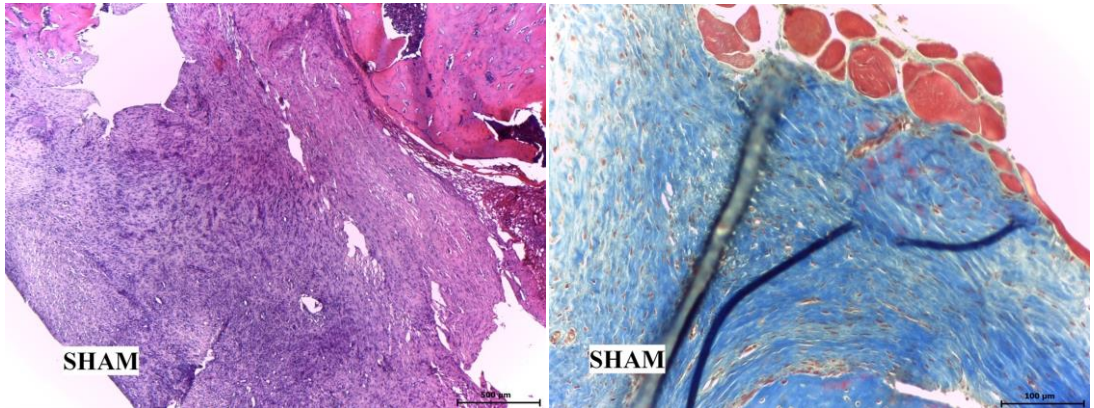
4.1.1. Işık mikroskopisi

Çalışmada kullanılan beş grubun her biri için değerlendirilen, damar sayısı, fibroblast yoğunluğu ve skar oluşumu skor tablosuna göre skorlandı. Deneklerde deri, derialtı ve laminatomi sahasında infeksiyonla uyumlu olabilecek histopatolojik bulguya rastlanmadı.



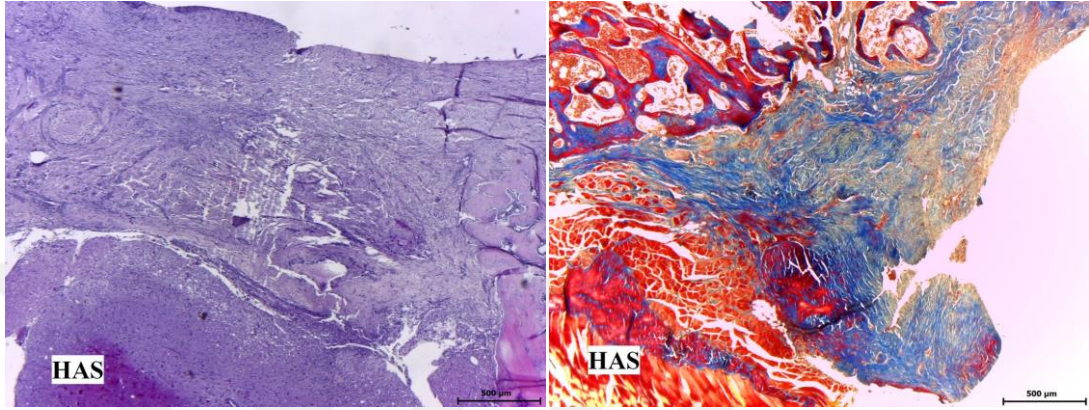
Resim 2: KONTROL grubuna ait histopatolojik görüntüleme (H&E, X400 ve MTS, X400)

Sağlıklı KONTROL grubunda herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanmadı. Fibroblast ve damar sayılarının fizyolojik sınırlar içinde olduğu görüldü. Medulla spinaliste herhangi bir reaksiyon tespit edilmedi (Resim 2).



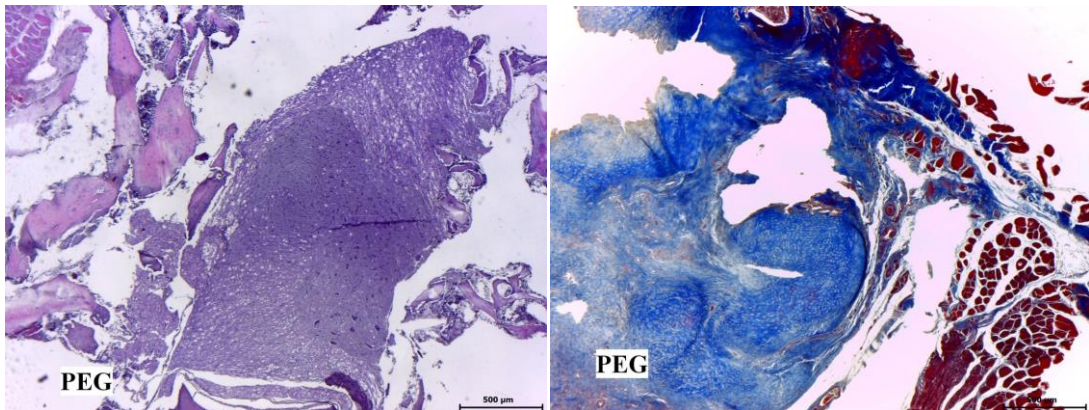
Resim 3: SHAM grubuna ait histopatolojik görüntüleme (H&E, X400 ve MTS, X400)

SHAM grubunda laminatomi sahasında belirgin bir skar dokusunun olduğu tespit edildi. Oluşan skar dokusunun da spinal kanala doğru ilerleyerek duraya yapıştığı görüldü. Yer yer kas nekrozlarına da rastlandı. Yaygın mononükleer hücre infiltrasyonları görüldü (Resim 3)



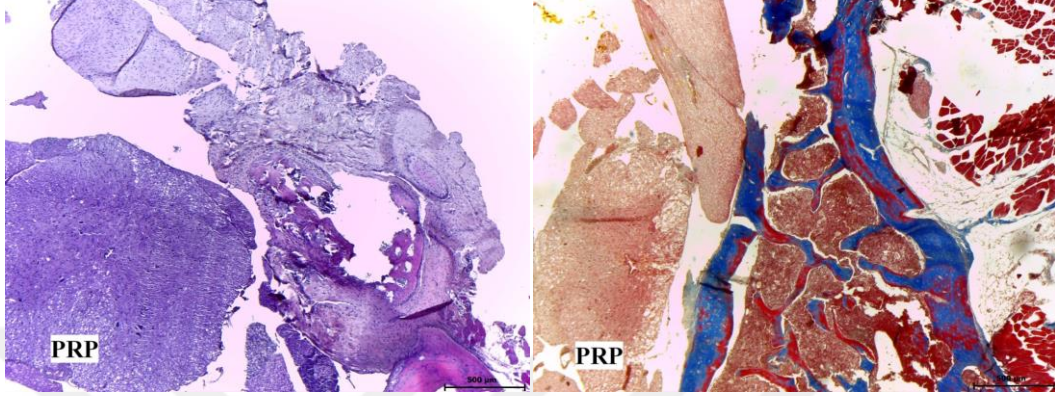
Resim 4: HAS grubuna ait histopatolojik görüntüleme (H&E, X400 ve MTS, X400)

HAS grubunda SHAM grubuna göre skar dokusunun daha hafif ancak PEG ve PRP grubuna kıyasla daha şiddetli olduğu görüldü. Doku düzeninin diğer müdahale gruplarına göre daha kötü olduğu görüldü (Resim 4)



Resim 5: PEG grubuna ait histopatolojik görüntüleme (H&E, X400 ve MTS, X400)

PEG grubunda belirgin bir skar dokusu tespit edildi. Medulla spinaliste nöronal nekroz ve vakuolizasyon tespit edildi. Doku düzeninin HAS grubuna göre biraz daha iyi olduğu tespit edildi (Resim 5).



Resim 6: PRP grubuna ait histopatolojik görüntüleme (H&E, X400 ve MTS, X400)

PRP grubunda SHAM grubuna göre skar dokusunun daha hafif olduğu görüldü. Medulla spinaliste nöronal nekroz ve vakuolizasyon tespit edildi. Ancak doku bütünlüğü yerindeydi. Diğer müdahale gruplarına göre dokunun daha uyumlu bir görünüme sahip olduğu tespit edildi. Fibroblast yoğunluğu PEG grubuna göre biraz daha fazlaydı (Resim 6).

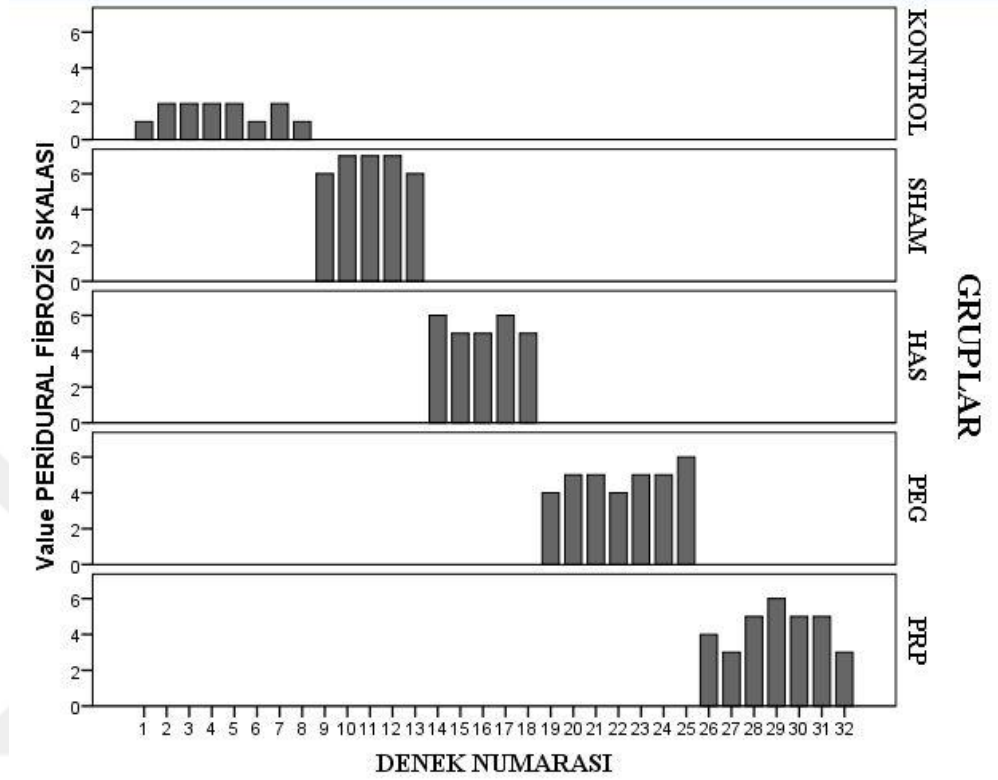
4.1.2. Histopatolojik evreleme sonuçları:

Grupların modifiye edilmiş evreleme sonuçlarına ait tanımlayıcı tablo ve bar grafiği aşağıda sunulmuştur (Tablo 2; Grafik 1).

Tablo2: Histopatolojik inceleme sonuçlarına ait tanımlayıcı tablo (N: grup içi denek sayısı; SS: standart sapma)

GRUP	N	Minimum	Maksimum	Ortanca (medyan)	SS
KONTROL	8	1	2	1	0.55
SHAM	5	6	7	7	0.55
HAS	5	5	6	5	0.55
PEG	7	4	6	5	0.69
PRP	7	3	6	5	1.13

Modifiye edilmiş histopatolojik evreleme sonuçları bakımından gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir farkın olduğu gözlemlendi ($X^2=25.001$, $p<0.001$) (Tablo 3)



Grafik 1: Histopatolojik evreleme puanlarına ait bar grafiği

Tablo 3: Tüm grupların histopatolojik evreleme sonuçlarının istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında gruplar arasında belirgin istatistiksel fark saptandı. *Kruskal Wallis* testi; $p<0.05$ (X^2 : ki-kare, df: serbestlik dereceleri)

DEĞİŞKEN	X^2	df	p
Peridural fibrozis evrelemesi	25.001	4	<0.001

Grupların ikili karşılaştırılması sonrasında ise KONTROL/ SHAM ($Z=-3.052$, $p=0.002$), KONTROL/ PRP ($Z=-3.328$, $p=0.001$), KONTROL/ HAS ($Z=-3.052$, $p=0.002$) ve KONTROL/PEG ($Z=-3.347$, $p=0.001$) grupları arasında istatistiksel farkın olduğu gözlemlendi (Tablo 4).

Tablo 4: Histopatolojik evreleme sonuçları bakımından grupların ikili istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında sadece KONTROL grubunun verileri ile diğer grupların verileri arasında belirgin istatistiksel fark saptandı. *Mann Whitney U* testi ve *Bonferroni* düzeltme testi; $p < 0.005$ (Z: Z puanı)

GRUPLAR	Z	p
KONTROL/ SHAM	-3.052	0.002
KONTROL/ HAS	-3.052	0.002
KONTROL/ PEG	-3.347	0.001
KONTROL/ PRP	-3.328	0.001
SHAM/ HAS	-2.324	0.020
SHAM/ PEG	-2.773	0.006
SHAM/ PRP	-2.743	0.006
HAS/ PEG	-1.373	0.170
HAS/ PRP	-1.576	0.115
PEG/ PRP	-0.687	0.492

Ancak KONTROL grubu dışarıda bırakılıp sadece cerrahi uygulanan gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel anlamlılık tespit edildi ($X^2=12.542$, $p=0.006$) (Tablo 5).

Tablo 5: KONTROL grubu hariç tutulduğunda histopatolojik evreleme sonuçları bakımından gruplar arasında farklılık olduğu saptandı. *Kruskall Wallis* testi, $p < 0.05$ (X^2 : ki-kare, df: serbestlik dereceleri).

Değişken	X^2	df	p
Peridural fibrozis evrelemesi	12.542	3	0.006

Tablo 6: Grupların ikili karşılaştırılması sonrasında PEG ve PRP gruplarının histopatolojik evreleme puanlarının diğer gruplardan düşük olduğu saptandı. *Mann Whitney U* testi ve *Bonferroni* düzeltme testi; $p < 0.0083$ (Z: Z puanı)

GRUPLAR	Z	p
SHAM/ HAS	-2.324	0.020
SHAM/ PEG	-2.773	0.006
SHAM/ PRP	-2.743	0.006
HAS/ PEG	-1.373	0.170
HAS/ PRP	-1.576	0.115
PEG/ PRP	-0.687	0.492

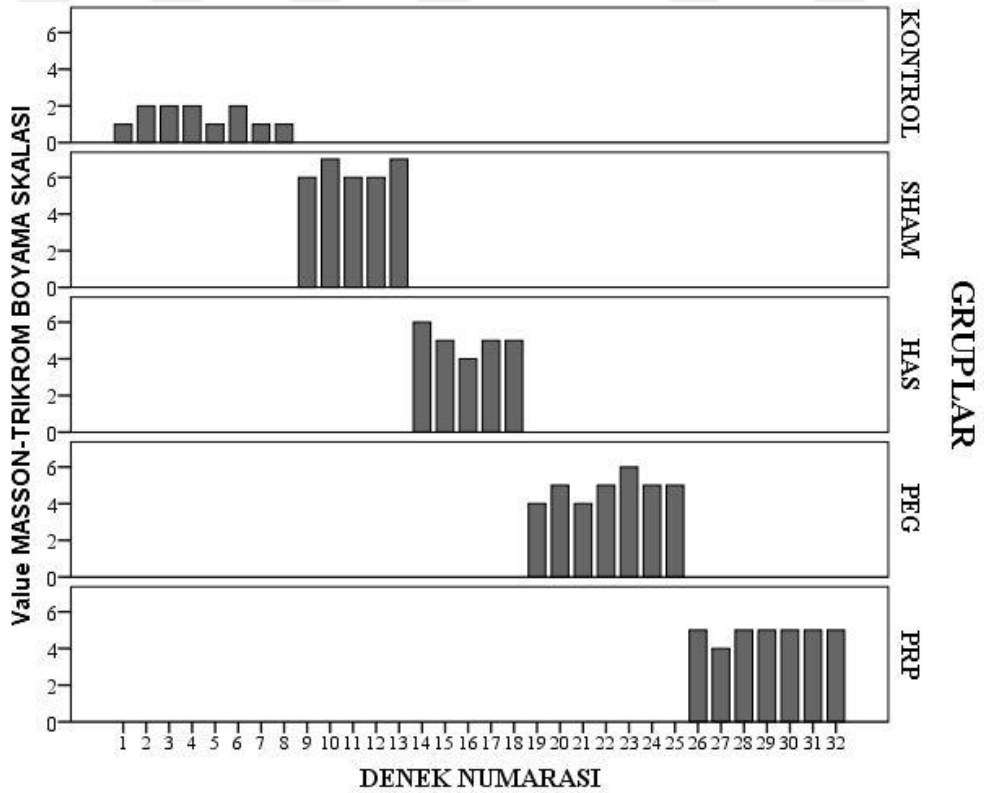
Grupların ikili karşılaştırılması sonrasında sadece SHAM/ PRP ($Z=-2.743$, $p=0.006$) ve SHAM/ PEG ($Z=-2.773$, $p=0.006$) grupları arasında istatistiksel anlamlı farklılık olduğu gözlemlendi (Tablo 6).

4.1.3. Masson Trikrom boyama (MTS) sonuçları

Her bir grubun Mason-Trikrom boyama skala sonuçlarına ait tanımlayıcı tablo ve bar grafiği aşağıda gösterilmiştir (Tablo 7, Grafik 2)

Tablo 7: MTS evreleme puanlarına ait tanımlayıcı tablo (N: grup içi denek sayısı; SS: standart sapma)

GRUPLAR	N	Minimum	Maksimum	Ortaca (medyan)	SS
KONTROL	8	1	2	2	0.54
SHAM	5	6	7	6	0.55
HAS	5	4	6	5	0.71
PEG	7	4	6	5	0.69
PRP	7	4	5	5	0.38



Grafik 2: Masson-Trikrom boyanma evreleme puanlarına ait bar grafiği

MTS evreleme puanları bakımından gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir farkın olduğu gözlemlendi ($X^2=25.119$, $p<0.001$) (Tablo 8)

Gruplar arası ikili karşılaştırmada ise KONTROL/ SHAM ($Z=-3.034$, $p=0.002$), KONTROL/ PRP ($Z=-3.412$, $p=0.001$), KONTROL/ HAS ($Z=-3.029$, $p=0.002$), KONTROL/ PEG ($Z=-3.334$, $p=0.001$) ve SHAM/ PRP ($Z=-3.064$, $p=0.002$) gruplarının MTS verileri arasında anlamlı istatistiksel farklılık olduğu gözlemlendi (Tablo 9).

Tablo 8: Tüm grupların MTS evreleme puanlarının istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında gruplar arasında belirgin istatistiksel fark saptandı. *Kruskal Wallis* testi; $p<0.05$ (X^2 : ki-kare, df: serbestlik dereceleri).

DEĞİŞKEN	X^2	df	p
MTS evreleme puanları	25.119	4	<0.001

Tablo 9: MTS evreleme puanlarına göre grupların ikili karşılaştırılması sonrasında PRP grubunun evreleme puanlarının SHAM grubundan daha düşük olduğu saptandı. Mann Whitney U testi ve *Bonferroni* düzeltme testi; $p<0.005$ (Z : Z puanı).

GRUPLAR	Z	P
KONTROL/ SHAM	-3.034	0.002
KONTROL/ HAS	-3.029	0.002
KONTROL/ PEG	-3.334	0.001
KONTROL/ PRP	-3.412	0.001
SHAM/ HAS	-2.410	0.016
SHAM/ PEG	-2.704	0.007
SHAM/ PRP	-3.064	0.002
HAS/ PEG	-0.366	0.714
HAS/ PRP	-0.428	0.669
PEG/ PRP	-0.081	0.936

KONTROL grubu verileri dışarıda tutulduğunda gruplar arası karşılaştırmada istatistiksel anlamlı farklılık olduğu görüldü ($X^2=12.226$, $p=0.007$) (Tablo 10)

Tablo 10: MTS evreleme puanlarına göre KONTROL grubu hariç tutulduğunda tüm grupların istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında gruplar arasında belirgin istatistiksel fark saptandı. *Kruskal Wallis* testi; $p < 0.05$ (X^2 : ki-kare, df: serbestlik dereceleri).

Değişken	X^2	df	p
MTS evreleme puanları	12.226	3	0.007

Grupların ikili karşılaştırılması sonrasında ise SHAM / PRP ($Z = -3.064$, $p = 0.002$) ve SHAM/ PEG ($Z = -2.704$, $p = 0.007$) gruplarının verileri arasında istatistiksel yönden anlamlı farklılık olduğu gözlemlendi (Tablo 11).

Tablo 11: MTS evreleme puanlarına göre grupların ikili karşılaştırılması sonrasında PEG ve PRP gruplarının evreleme puanlarının diğer gruplardan düşük olduğu saptandı. Mann Whitney U testi ve *Bonferroni* düzeltme testi; $p < 0.0083$ (Z : Z puanı).

GRUPLAR	Z	P
SHAM/ HAS	-2.410	0.016
SHAM/ PEG	-2.704	0.007
SHAM/ PRP	-3.064	0.002
HAS/ PEG	-0.366	0.714
HAS/ PRP	-0.428	0.669
PEG/ PRP	-0.081	0.936

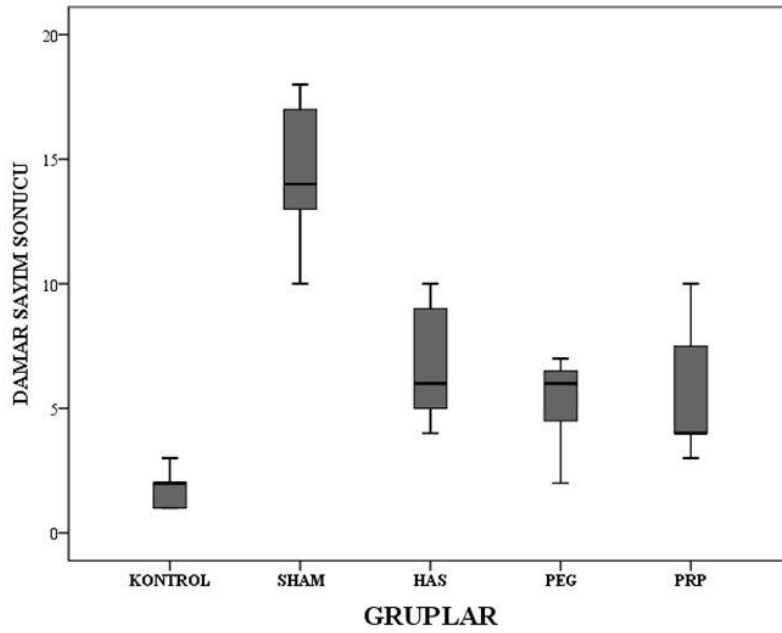
4.1.4. Damar sayımı sonuçları

Her bir gruba ait damar sayımı sonuçlarına ait tanımlayıcı tablo ve grafik aşağıda sunulmuştur (Tablo 12, Grafik 3)

Damarsal yapıların sayım sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında tüm gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık tespit edildi ($F = 21.849$, $p < 0.001$) (Tablo 13)

Tablo 12: Damar sayımı sonuçlarına ait tanımlayıcı tablo (N: grup içi denek sayısı; SS: standart sapma)

GRUPLAR	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	SS
KONTROL	8	1	3	1.75	0.71
SHAM	5	10	18	14.40	3.21
HAS	5	4	10	6.80	2.59
PEG	7	2	10	5.71	2.50
PRP	7	3	10	5.71	2.75



Grafik 3: Her bir gruba ait damar sayım sonuçları error bar grafiği

Tablo 13: Tüm grupların damar sayımı sonuçlarının istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında gruplar arasında belirgin istatistiksel fark saptandı. *One-Way ANOVA* testi; $p < 0.05$ (df: serbestlik dereceleri).

DEĞİŞKEN	df	F	p
Damar sayım sonucu	4	21.849	<0.001

Gruplar arası ikili karşılaştırmada KONTROL/ SHAM ($p < 0.001$), KONTROL/ HAS ($p = 0.008$), KONTROL/ PEG ($p = 0.026$), KONTROL/ PRP ($p = 0.026$), SHAM/ HAS

($p<0.001$), SHAM/ PEG ($p<0.001$) ve SHAM/ PRP ($p<0.001$) gruplarının verileri arasında anlamlı fark olduğu tespit edildi (Tablo 14).

Tablo 14: Damar sayımı sonuçlarına göre grupların ikili karşılaştırılması sonrasında HAS, PEG ve PRP gruplarının damar sayımı sonuçlarının diğer gruplardan düşük olduğu saptandı. *One-Way ANOVA-Tukey HSD Multiple Comparisons* testi $p<0.05$.

GRUP	ORTALAMA FARK (I/J)	STANDART HATA	p
KONTROL/ SHAM	-12.650	1.363	<0.001
KONTROL/ HAS	-5.050	1.363	0.008
KONTROL/ PEG	-3.964	1.237	0.026
KONTROL/ PRP	-3.964	1.237	0.026
SHAM/ HAS	7.600	1.512	<0.001
SHAM/ PEG	8.686	1.400	<0.001
SHAM/ PRP	8.686	1.400	<0.001
HAS/ PEG	1.086	1.400	0.935
HAS/ PRP	-1.086	1.400	0.935
PEG/ PRP	0.000	1.278	1.000

Öte yandan KONTROL grubu verileri dışarıda bırakıldığında yine gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık tespit edildi ($X^2=11.11.382$, $p=0.010$) (Tablo 15)

Tablo 15: KONTROL grubu dışarıda bırakıldığında tüm grupların damar sayımı sonuçlarının istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında gruplar arasında belirgin istatistiksel fark saptandı. *One-Way ANOVA* testi; $p<0.05$ (df: serbestlik dereceleri).

DEĞİŞKEN	X^2	df	p
DAMAR	11.382	3	0.010

Grupların ikili karşılaştırması sonrasında ise SHAM/ HAS ($p=0.002$), SHAM/ PEG ($p<0.001$) ve SHAM/ PRP ($p<0.001$) gruplarının verileri arasında anlamlı istatistiksel fark olduğu tespit edildi (Tablo 16).

Tablo 16: KONTROL grubu dışarıda bırakılarak yapılan grupların ikili karşılaştırılması sonrasında HAS, PEG ve PRP gruplarının damar sayım sonuçlarının diğer gruplardan düşük olduğu saptandı. *One-Way ANOVA-Tukey HSD Multiple Comparisons* testi, $p < 0.05$

GRUP	ORTALAMA FARK (I/J)	STANDART HATA	p
SHAM/ HAS	7.600	1.737	0.002
SHAM/ PEG	8.686	1.608	<0.001
SHAM/ PRP	8.686	1.608	<0.001
HAS/ PEG	1.086	1.608	0.905
HAS/ PRP	-1.086	1.608	0.905
PEG/ PRP	0.000	1.468	1.000

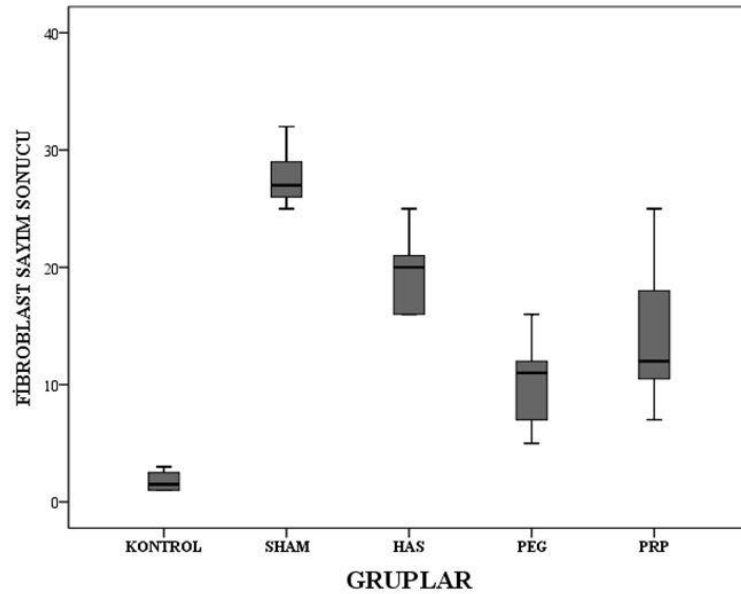
4.1.5. Fibroblast sayımı sonuçları

Fibroblast sayımı sonuçlarına ait tanımlayıcı tablo ve grafik aşağıda sunulmuştur

(Tablo 17, Grafik 4)

Tablo 17: Fibroblast sayımı sonuçlarına ait tanımlayıcı tablo (N: grup içi denek sayısı; SS: standart sapma)

GRUP	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	SS
KONTROL	8	1	3	1.75	0.89
SHAM	5	25	32	27.80	2.78
HAS	5	5	25	17.40	7.63
PEG	7	5	16	10.00	3.87
PRP	7	7	25	14.43	6.29



Grafik 4: Her bir gruba ait fibroblast sayım sonuçları error bar grafiği

Fibroblast sayım sonuçları bakımından tüm gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık olduğu tespit edildi (F=25.781, p<0.001) (Tablo 18)

Tablo 18: Tüm grupların fibroblast sayımı sonuçlarının istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında gruplar arasında belirgin istatistiksel fark saptandı. *One-Way ANOVA* testi; p<0.05 (df: serbestlik dereceleri).

DEĞİŞKEN	df	F	p
Fibroblast sayım sonuçları	4	25.781	<0.001

Gruplar arası ikili karşılaştırmalar sonrasında KONTROL/ SHAM (p<0.001), KONTROL/ HAS (p<0.001), KONTROL/ PEG (p=0.017), KONTROL/ PRP (p<0.001), SHAM/ HAS (p=0.013), SHAM/ PEG (p<0.001) ve SHAM/ PRP (p<0.001) grupları arasında fibroblast sayım sonuçları bakımından istatistiksel anlamlı farklılık olduğu gözlemlendi (Tablo 19).

Tablo 19: Grupların ikili karşılaştırılması sonrasında HAS, PEG ve PRP gruplarının fibroblast sayım sonuçlarının diğer gruplardan düşük olduğu saptandı. *One-Way ANOVA-Tukey HSD Multiple Comparisons* testi, p<0.05

GRUPLAR	ORTALAMA FARK	STANDART HATA	p
KONTROL/ SHAM	-26.050	2.681	<0.001
KONTROL/ HAS	-15.650	2.681	<0.001
KONTROL/ PEG	-8.250	2.434	0.017
KONTROL/ PRP	-12.679	2.434	<0.001
SHAM/ HAS	10.400	2.974	0.013
SHAM/ PEG	17.800	2.754	<0.001
SHAM/ PRP	13.371	2.754	<0.001
HAS/ PEG	7.400	2.754	0.082
HAS/ PRP	2.971	2.754	0.816
PEG/ PRP	-4.429	2.514	0.415

KONTROL grubu dışarıda bırakılarak veriler tekrar analiz edildiğinde gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık olduğu gözlemlendi (Tablo 20)

Tablo 20: KONTROL grubu dışarıda bırakılarak yapılan istatistiksel analizde fibroblast sayım sonuçlarının tüm gruplar arasında farklı olduğu gözlemlendi. *One-Way ANOVA* testi; $p < 0.05$ (df: serbestlik dereceleri).

DEĞİŞKEN	df	F	p
Fibroblast sayım sonucu	4	10,909	<0.001

Gruplar arası ikili karşılaştırmalar sonrasında SHAM/ HAS ($p=0.031$), SHAM/ PEG ($p < 0.001$) ve SHAM/ PRP ($p=0.002$) grupları arasında fibroblast sayım sonuçları bakımından istatistiksel anlamlı farklılık olduğu gözlemlendi (Tablo 21).

Tablo 21: KONTROL grubu dışarıda bırakılarak yapılan grupların ikili karşılaştırılması sonrasında HAS, PEG ve PRP gruplarının fibroblast sayım sonuçlarının salt cerrahi grubundan düşük olduğu saptandı. *One-Way ANOVA-Tukey HSD Multiple Comparisons* testi, $p < 0.05$

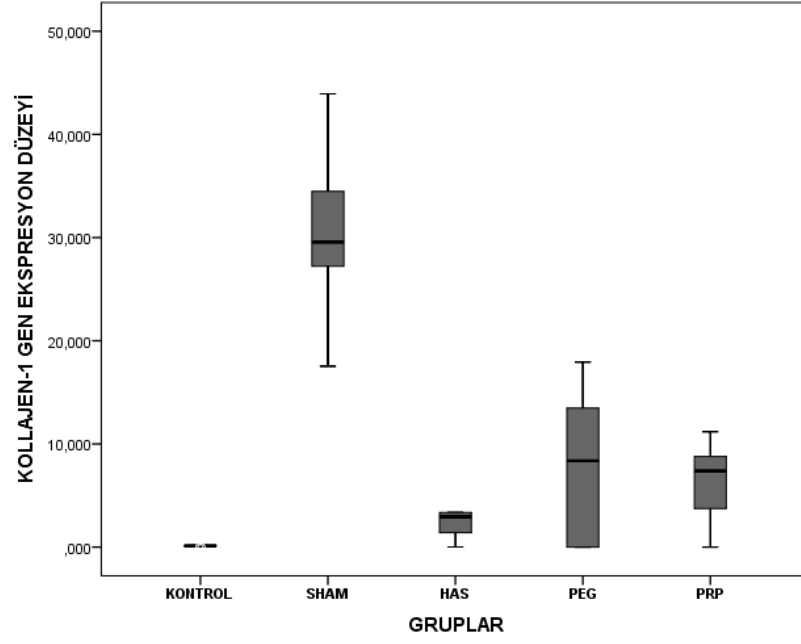
GRUP	ORTALAMA FARK (I/J)	STANDART HATA	p
SHAM/ HAS	10.400	3.440	0.031
SHAM/ PEG	17.800	3.185	<0.001
SHAM/ PRP	13.371	3.185	0.002
HAS/ PEG	7.400	3.185	0.126
HAS/ PRP	2.971	3.185	0.788
PEG/ PRP	4.429	2.907	0.443

4.2. PCR inceleme bulguları

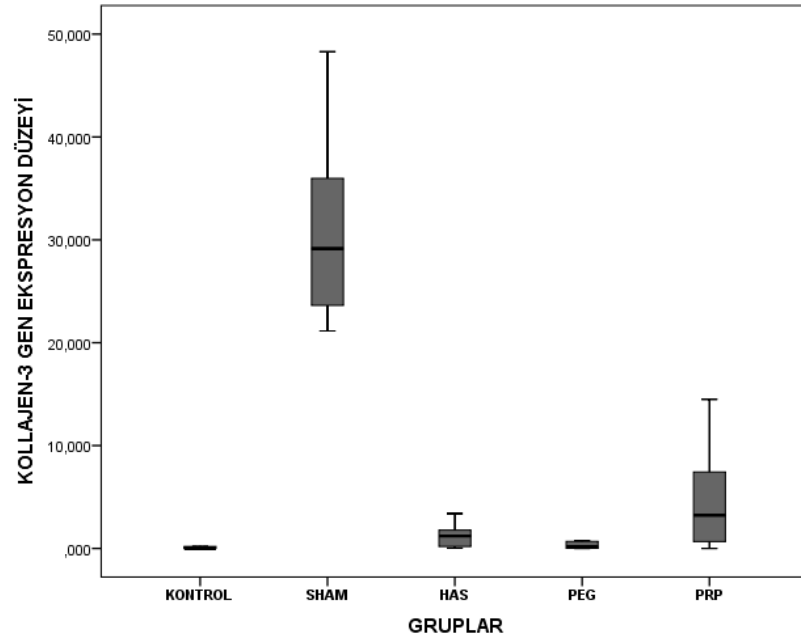
PCR yöntemi kullanılarak elde edilen kollajen tip-1 ve tip-2, TGF-1 β ve TNF- α gen ekspresyon analiz sonuçları aşağıda tablo ve grafik halinde verilmiştir (Tablo 22, Grafik 5, Grafik 6, Grafik 7, Grafik 8).

Tablo 22: Kollajen tip 1, kollajen tip 3, TGF-1 β ve TNF- α gen ekspresyon analiz sonuçlarına ait tanımlayıcı tablo (N: grup içi denek sayısı; SS: standart sapma)

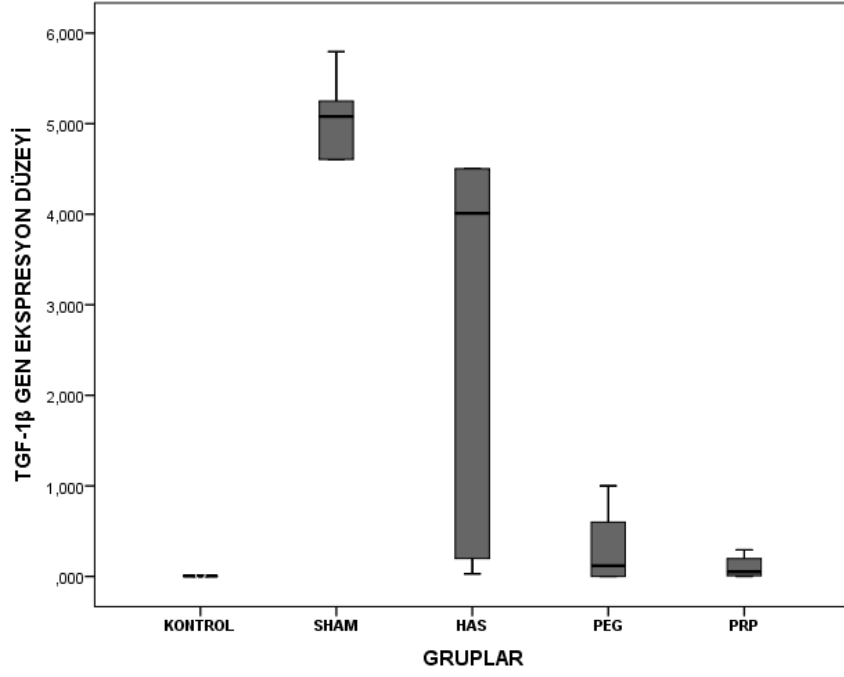
Değişken	Grup	Minimum	Maksimum	Medyan	SD
Kollajen tip 1	KONTROL	0.001	0.386	0.127	0.14
	SHAM	17.540	43.930	29.563	9.69
	HAS	0.014	7.430	2.950	2.79
	PEG	0.002	17.930	8.376	7.72
	PRP	0.006	11.190	7.380	4.28
Kollajen tip 3	KONTROL	0.004	0.709	0.022	0.30
	SHAM	21.139	48.29	29.147	10.92
	HAS	0.032	3.395	1.206	1.37
	PEG	0.005	0.751	0.165	0.36
	PRP	0.003	14.500	3.224	5.30
TGF-1 β	KONTROL	0.000	0.019	0.006	0.01
	SHAM	3.487	5.795	5.078	0.87
	HAS	0.029	12.810	4.010	5.19
	PEG	0.000	2.778	0.119	1.03
	PRP	0.000	0.293	0.052	0.20
TNF- α	KONTROL	0.990	6.822	5.782	2.71
	SHAM	4.658	8.737	6.224	1.50
	HAS	0.002	4.766	3.092	1.73
	PEG	0.531	7.171	4.769	2.35
	PRP	2.464	7.992	4.119	2.31



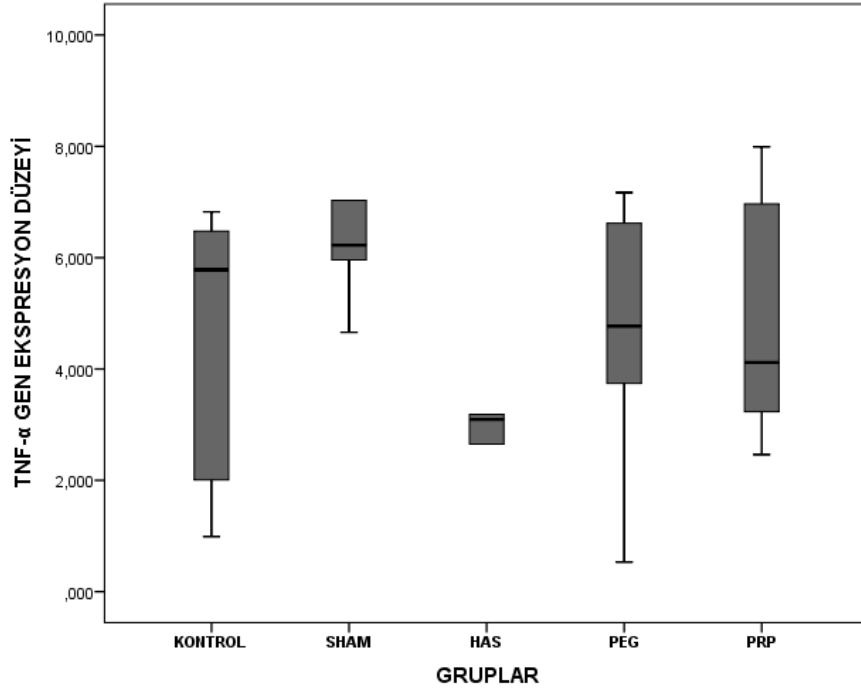
Grafik 5: Her bir gruba ait kollajen tip 1 gen ekspresyon analiz sonuçları error bar grafiği



Grafik 6: Her bir gruba ait kollajen tip 3 gen ekspresyon analiz sonuçları error bar grafiği



Grafik 7: Her bir gruba ait TGF-1 β gen ekspresyon analiz sonuçları error bar grafiği



Grafik 8: Her bir gruba TNF- α gen ekspresyon analiz sonuçları error bar grafiği

PCR gen ekspresyon analizi sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında tüm gruplar arasında kollajen tip-1 ($X^2=14.554$, $p=0.006$), kollajen tip-3 ($X^2=16.741$, $p=0.002$) ve TGF-1 β ($X^2=16.351$, $p=0.003$) düzeyleri açısından istatistiksel anlamlı farklılık tespit edildi (Tablo 23).

Tablo 23: Tüm grupların kollajen tip 1, kollajen tip 3 ve TGF-1 β gen ekspresyon analiz sonuçlarının istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında gruplar arasında belirgin istatistiksel fark saptandı. *Kruskal Wallis* testi; $p<0.05$ (X^2 : ki-kare, df: serbestlik dereceleri).

Değişken	X^2	df	p
Kollajen tip-1	14.554	4	0.006
Kollajen tip-3	16.741	4	0.002
TGF-1 β	16.351	4	0.003
TNF- α	6.446	4	0.168

Tablo 24: Tüm grupların istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında PRP isimli etken maddenin kollajen tip 1, kollajen tip 3 ve TGF-1 β düzeylerini belirgin oranda azaltırken PEG isimli ajanın sadece kollajen tip 3 ve TGF-1 β düzeylerini belirgin oranda azalttığı tespit edildi. *Mann Whitney U* testi ve *Bonferroni* düzeltme testi; $p<0.005$ (Z: Z puanı)

GRUP	Kollajen tip-1		Kollajen tip-3		TGF-1 β	
	Z	p	Z	p	Z	p
KONTROL/ SHAM	-2.611	0.009	-2.611	0.009	-2.611	0.009
KONTROL/ HAS	-1.776	0.076	-1.984	0.047	-2.611	0.009
KONTROL/ PEG	-0.893	0.372	-0.244	0.808	-1.056	0.291
KONTROL/ PRF	-2.192	0.028	-1.705	0.088	-1.218	0.223
SHAM/ HAS	-2.611	0.009	-2.611	0.009	-1.149	0.251
SHAM/ PEG	-2.680	0.007	-2.842	0.004	-2.842	0.004
SHAM/ PRP	-2.842	0.004	-2.842	0.004	-2.842	0.004
HAS/ PEG	-0.406	0.685	-1.705	0.088	-1.868	0.062
HAS/ PRP	-1.056	0.291	-0.731	0.465	-1.868	0.062
PEG/ PRP	-0.319	0.749	-1.853	0.064	-0.319	0.749

Gruplar arası ikili karşılaştırmada kollajen tip 1 ekspresyon düzeylerinin SHAM/ PRP (Z=-2.842, p=0.004) grupları arasında farklı olduğu gözlemlendi. Kollajen tip 3 gen ekspresyon düzeylerinin ise SHAM/ PEG (Z=-2.842, p=0.004) ve SHAM/ PRP (Z=-2.842, p=0.004) grupları arasında farklı olduğu gözlemlendi. TGF-1 β gen ekspresyon düzeylerinin de yine SHAM/ PEG (Z=-2.842, p=0.004) ve SHAM/ PRP (Z=-2.842, p=0.004) grupları arasında farklı olduğu saptandı (Tablo 24).

Diğer yandan KONTROL grubu verileri dışarıda bırakılarak yapılan istatistiksel analizler sonunda kollajen tip 1 ($X^2=11,397$, p=0.010), kollajen tip 3 ($X^2=14,361$, p=0.002) ve TGF-1 β ($X^2=12,627$, p=0.006) gen ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında farklı olduğu tespit edildi (Tablo 25).

Gruplar arası ikili karşılaştırmada kollajen tip 1 ekspresyon düzeylerinin SHAM/ PEG (Z=-2.680, p=0.007) ve SHAM/ PRP (Z=-2.842, p=0.004) grupları arasında farklı olduğu gözlemlendi. Diğer yandan kollajen tip 3 gen ekspresyon düzeylerinin SHAM/ PEG (Z=-2.842, p=0.004) ve SHAM/ PRP (Z=-2.842, p=0.004) grupları arasında farklı olduğu da gözlemlendi. TGF-1 β gen ekspresyon düzeylerinin de yine SHAM/ PEG (Z=-2.842, p=0.004) ve SHAM/ PRP (Z=-2.842, p=0.004) grupları arasında farklı olduğu saptandı (Tablo 26).

Tablo 25: KONTROL grubu verileri dışlandığında diğer grupların kollajen tip 1, kollajen tip 3 ve TGF-1 β gen ekspresyon analiz sonuçlarının istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında gruplar arasında belirgin istatistiksel fark saptandı. *Kruskal Wallis* testi; p<0.05 (X^2 : ki-kare, df: serbestlik dereceleri).

Değişken	X^2	df	p
Kollajen tip-1	11.397	3	0.010
Kollajen tip-3	14.361	3	0.002
TGF-1 β	12.627	3	0.006
TNF- α	6.634	3	0.085

Tablo 26: Tüm grupların istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında PEG ve PRP isimli etken maddenin kollajen tip 1, kollajen tip 3 ve TGF-1 β düzeylerini belirgin ve benzer oranda azalttığı tespit edildi. *Mann Whitney U* testi ve *Bonferroni* düzeltme testi; $p < 0.0083$ (Z: Z puanı)

GRUP	Kollajen tip-1		Kollajen tip-3		TGF-1 β	
	Z	p	Z	p	Z	p
SHAM/ HAS	-2.611	0.009	-2.611	0.009	-1.149	0.251
SHAM/ PEG	-2.680	0.007	-2.842	0.004	-2.842	0.004
SHAM/ PRP	-2.842	0.004	-2.842	0.004	-2.842	0.004
HAS/ PEG	-0.406	0.685	-1.705	0.088	-1.868	0.062
HAS/ PRP	-1.056	0.291	-0.731	0.465	-1.868	0.062
PEG/ PRP	-0.319	0.749	-1.853	0.064	-0.319	0.749

5. TARTIŞMA

5.1. Histopatolojik evreleme sonuçları

Peridural skar oluşumunda paravertebral adalelerden ve özellikle erektr spinal adalelerden gelen fibroblastların sorumlu olduğu bilinmektedir (98). Peridural fibrozisi engellemeye yönelik kullanılan bariyerlerin (gelfoam, silastik, zenoderm, dakron, vicryl mesh, oxiplex, karboksimetilselülöz, biyolojik yıkılabilir polimerler, biyoelastik polimerler polietilen oksit) yabancı cisim gibi algılandığı ve absorbe edilebilmesi için yara ortamına fagositoz yapan hücreleri çektiği gösterilmiştir. Her ne kadar bu bariyerler bu inflamatuvar hücreleri duradan uzak tutacakmış gibi görünse de ortamda oluşan fagositozun ve yabancı cisim reaksiyonunun durayı da etkilediği ve bu alanda yine de yapışıklıklara neden olabildiği gösterilmiştir.

Peridural fibrozisi önlemeye yönelik kullanılan otolog yağ greftlerinin dokuya inert olduğu, kolay elde edilip ekonomik açıdan ucuz olduğu ve orijinal dokudakine benzer şekilde peridural mesafede bariyer etkisi oluşturabileceği düşünülmüş ve klinikte de uygulanmıştır. Ancak sonrasında bu yağ greftlerinin konulduğu yerden başka yerlere migre olup kitle etkisi oluşturabildiği, rezorbe olabildiği, peridural mesafeyi tam örtemediği ve daha önemlisi fibrozisi engelleyemediği, ayrıca donör alanda da çeşitli sorunlara (ağrı, seroma oluşumu, hematoma, infeksiyon gibi) neden olabildiği görülmüş ve uygulamadan vazgeçilmiştir.

Ayrıca literatürde politetrafluoroetilen membran da peridural fibrozisi engellemek amacıyla kullanılmış ancak daha sonra bu malzemenin de başarısız olduğu gösterilmiştir (56, 69, 91).

Daha önce literatürde etkinliği kabul edilen *ADCON-L*'nin önemli avantajlarından biri jel kıvamında olup kolay uygulanabilmesi ve disk bölgesinden laminektomi sahasına kadar olan operasyon bölgesindeki boşluğu rahatlıkla doldurabilmesi ve bu bölgedeki fibrozis gelişimini azaltabilmesidir (21, 76). Yapılan çok merkezli randomize bir klinik

çalışmada ADCON-L' nin aşırı skar oluşumunu kontrol grubuna göre %23, aktivite ile ortaya çıkan radiküler ağrıları ise kontrol grubuna göre %50 oranında azalttığı gösterilmiştir (70). Ancak tüm bu bulguların aksine bu dural bariyerin etkilerinin uzun dönem takibinde dural yırtıkların iyileşmesini engellediği ve peridural alanda yabancı cisim reaksiyonuna neden olduğu da bildirilmiştir (23). Ayrıca 398 hasta üzerinden yapılan çok merkezli kontrollü bir çalışmada ise literatürdeki sonuçların aksine ADCON-L' nin epidural fibrozisi önlemede etkili olmadığı bildirilmiştir (76). İlâveten Kessel ve ark ikinci kez opere ettikleri hastalara ADCON-L uygulamışlar ve bu dural bariyerin istatistiksel olarak anlamlı sayılamayacak kadar küçük bir grupta peridural fibrozisi azalttığını bildirmişlerdir (45).

Diğer yandan daha önceki denemelerde *steroidlerin* ve *steroid olmayan antiinflamatuar ilaçların* (NSAID) yara yerindeki topikal kullanımında her ne kadar peridural fibrozisi azalttığı gösterilmiş olsa da komplikasyon olarak yaradaki tensil güçleri azalttığı ve yaranın kapanmasını engellediği de tespit edilmiştir (2).

Chitosan isimli malzemenin fibroblast proliferasyonunu, prokollajen üretimini ve aynı zamanda TGF-1 β , FGF, ve IL-8 yapımını engellediği ve böylece peridural fibrozis belirgin şekilde azalttığı gösterilmiştir (53).

Mitomisin-C peridural fibrozisi önlemede kullanılan bir diğer farmakolojik ajan olup mitozu baskılayıcı özelliği ile fibroblast proliferasyonunu önlerken caspase-3 proteaz yolu üzerinden fibroblast apoptozunu indüklediği tespit edilmiştir. Ancak bu molekülün yaralarda yüksek dozda ve/ veya uzun süreli lokal kullanımının hem toksik etki oluşturduğu hem fibrozisi arttırdığı ve hem de yara iyileşmesini bozduğu savunulmuştur.

Aprotinin bir proteinaz inhibitörü ve antiinflamatuar ajan olup lökosit infiltrasyonunu, lökosit granülasyonunu ve lizozomal enzim sekresyonunu azalttığı bilinmektedir. Bu özellikleri sayesinde düşük yan etki insidansı ile birlikte skar oluşumunu azaltıcı etkisi de vardır. Klinik uygulamalarda özellikle intraabdominal cerrahi girişimlerde kullanıldığında postoperatif karın içi organ yapışıklıklarını belirgin düzeyde azaltabildiği kanıtlanmıştır. Peridural fibrozisi azalttığı da deneysel olarak gösterilmiştir (49)

Doku plazminojen aktivatörü (tissue plasminogen activator; tPA) fibrin spesifik ve pıhtı spesifik fibrinolitik ajan olup damar tıkanıklıklarında tıkanıklığı açmaya yönelik akut dönemde sıklıkla kullanılmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda laminektomi alanında oluşan pıhtının fibrozis oluşumuna zemin hazırladığı öne sürülmüştür. Bu pıhtıyı çözmeye yönelik lokal uygulanan tPA' nın peridural fibrozisi engelleyemediği gösterilmiştir (16).

PEG suda çözünen bir polimer olup elektriksel aktivitesi olmayan, spesifik organ yönelimi bulunmayan, immünojenik ve toksik özellikte olmayan inert (doku ve hücrelerle uyumlu) bir moleküldür (55). Daha önce beyin-omurilik sıvısı (BOS) kaçaklarını önlemeye yönelik bariyer olarak kullanılan PEG örtülerinin (dural sealant) hem BOS kaçağını önlemede ve hem de uygulandığı bölgede histopatolojik yönden yapışıklığı ve fibrozisi azaltmada etkin olduğu gösterilmiştir (73). Ancak bu çalışmada ileri düzey histopatolojik ve moleküler biyolojik incelemelerle sonuçlar desteklenmemiştir.

Bizim çalışmamızda histopatolojik inceleme sonuçlarına bakıldığında peridural fibrozis düzeyi bakımından KONTROL grubu ile diğer gruplar arasında belirgin farklılık olduğu gözlemlendi. Ancak SHAM grubu verileri ile etken maddelerin uygulandığı grupların verileri arasında istatistiksel farklılık saptanmadı. Bu sonuçlarla her üç etken maddenin de peridural fibrozisi azaltmada kontrol grubu düzeyine ulaştırabilecek etkinliğinin olmadığı düşünüldü. Öte yandan KONTROL grubu verileri dışarıda bırakılarak sonuçlar tekrar gözden geçirildiğinde SHAM grubuna göre PRP ve PEG isimli etken maddelerin peridural fibrozisi belirgin ve benzer düzeyde azalttığı gözlemlendi. Hyaluronik asidin ise bu fibrozisi azaltmada bu iki etken madde kadar etkili olamadığı düşünüldü. Sonuç olarak PEG ve PRP isimli etken maddelerin peridural fibrozisi normal doku düzeyine yaklaştırmasa da salt cerrahi yapılan dokuya göre belirgin ve benzer düzeyde azalttığı gözlemlendi.

Peridural fibrozisin boyanma yöntemi ile ortaya konulduğu MTS evreleme sonuçlarına bakıldığında ise PEG ve hyaluronik asidin fibrozisi azaltmada KONTROL grubu verilerine göre etkinliğinin olmadığı gözlemlendi. Ancak PRP isimli etken maddenin SHAM

grubuna göre daha iyi sonuçlara sahip olduğu fibrozis düzeylerini KONTROL grubu verilerine yaklaştırabildiği düşünüldü. KONTROL grubu verileri dışarıda bırakılarak sonuçlar tekrar analiz edildiğinde ise PEG ve PRP isimli etken maddelerin salt cerrahi grubu verilerine göre peridural fibrozisi belirgin ve benzer düzeyde azalttığı saptandı. Hyaluronik asidin ise fibrozisi bu iki etken madde kadar azaltmadığı düşünüldü. Sonuç olarak PEG ve PRP isimli etken maddelerin peridural fibrozisi normal doku düzeyine yaklaştırmasa da salt cerrahi yapılan dokuya göre belirgin ve benzer düzeyde azalttığı gözlemlendi.

Damar sayım sonuçlarının analizleri sonunda her üç etken maddenin de yaralı dokudaki damar oluşum düzeylerini salt cerrahi yapılan gruba göre belirgin ve benzer düzeyde azalttığı ancak normal doku sınırlarına çekemediği gözlemlendi. KONTROL grubu verileri dışarıda bırakılarak yapılan analizler sonunda da bu sonuçların değişmediği saptandı. Sonuç olarak her üç etken maddenin de cerrahi yapılan alanda yeni damarlanmayı belirgin ve benzer düzeyde azaltabildiği sonucuna ulaşıldı.

Fibroblast sayımı sonuçlarının analizi sonunda ise her üç etken maddenin de cerrahi yapılan dokuda fibroblast sayısını belirgin ve benzer düzeylerde azalttığı ancak KONTROL grubu verilerine yaklaştıramadığı saptandı. KONTROL grubu verileri dışarıda bırakılarak yapılan analizlerde de bu sonuçların değişmediği gözlemlendi. Sonuç olarak her üç etken maddenin de cerrahi yapılan alanda fibroblast sayısını belirgin ve benzer düzeyde azaltabildiği düşünüldü ve bu sonuçlarla da her üç etken maddenin de cerrahi alana fibroblast göçünü belirgin ve benzer düzeyde engelleyebildiği sonucuna ulaşıldı.

5.2. PCR gen ekspresyon analizi sonuçları

“Tissue Growth Factor-1beta (TGF-1 β)” dimerik bir protein olup alt tipleri vardır ve bu protein ailesinin embriyonik gelişim, hemostaz, yara iyileşmesi, kemotaksis ve hücre siklusu üzerinde etkileri vardır. Yaralanma sonrası TGF-1 β salınımı olur ve bu sitokin Tip 1 (Th1) immün cevabın oluşmasında görev alan bir sitokindir. Bu sitokin yara yerine gelecek olan nötrofilleri, makrofajları ve fibroblastları uyarır. Bu ise ortama ulaşan bu hücrelerin

daha fazla TGF-1 β salmasına ve fibroblastlarda TGF-1 β reseptörlerinin artmasına neden olur. Böylece fibrotik işlemlerin başlaması da sağlanmış olur. Sonuç olarak TGF-1 β yara iyileşmesinde fibrozisi artırıcı bir profibrotik proteindir. Trombositlerde, makrofajlarda, mast hücrelerinde, fibrositlerde ve fibroblastlarda sentezlenir ve salınır. Mezenkimal hücreleri uyarak hem bu hücrelerin proliferasyonunu ve hem de neovaskülarizasyonu, ECM depolanmasını ve özellikle kollajen tip I sentezini artırır (52). Ayrıca bu protein matriks metalloproteinazların aktivitelerini baskılar ve proteaz inhibitörlerini (plazminojen aktivatör inhibitör1 ve TIMP gibi) indükler (37). Yapılan araştırmalarda TGF-1 β hem hücre hayatta kalımını artırırken hem de apoptoz mekanizmalarına katıldığı, hem hücre çoğalmasını artırırken hem de hücre farklılaşmalarını indüklediği ve immün cevap mekanizmalarında antiinflamatuvar etkiye sahip olduğu ve ekstrasellüler matriks depolanmasını, anjiogenezi, doku hemostazını artırdığı gösterilmiştir (97). Ayrıca kütanöz dokularda nedbe oluşumunu da indüklediği bildirilmiştir. Diğer yandan bu sitokin skar dokusundaki laminin, fibronektin ve kollajen tip 1, kollajen tip 3 ve kollajen tip 4 sentezini artırdığı da saptanmıştır; ancak peridural fibrozis oluşumundaki yeri hakkında yeterli literatur bilgisine ulaşamamıştır (95).

“*Tumor necrosis factor-alfa (TNF- α)*” bir proinflamatuvar sitokindir. Yaralanma esnasında ve sonrasında trombositlerden, mast hücrelerinden, nötrofillerden, makrofajlardan ve fibrositlerden salınır. Bu sitokinin IL-1 ve IFN- γ tarafından etkilerinin değiştirilebildiği de bilinmektedir. Bu sitokin matriks metalloproteinazları aktive ederek inflamasyon oluşumunda, reepitelizasyonda, ECM depolanmasının azaltılmasında, neovaskülarizasyonda ve kollajen sentezinin azaltılmasında görevler alır. Özellikle TGF-1 β üzerindeki baskılayıcı etkilerini NF-KB hücreleri üzerinden gösterir (43, 52).

“*Interferon-gamma (IFN- γ)*” pleotropik bir protein olup T lenfositlerden ve NK hücrelerinden salınır ve bu sitokin de Tip 1 (Th1) immün cevabın oluşmasında görev alan bir sitokindir. Tip 1 immün cevap iyileşme ve restorasyonda görevli sitokinlerin olduğu bir

yanıttır. Bu sitokin diğer Th1 sitokinlerin üretiminden ve oluşumundan sorumludur ve aynı zamanda Th2 immün cevabın oluşumunu da baskılar. Yapılan *in vivo* ve *in vitro* deneysel çalışmalarda Th1 immün cevabın fibrozis oluşumunda sorumlu olduğu gösterilmiştir. Bu protein aynı zamanda antifibrotik olarak fibroblast çoğalmasını engellerken kollajen gen ekspresyonunu, kollajen sentezini ve ECM depolanmasını da azaltır. Ayrıca TGF-1 β ile etkileşime girerek bu proteinin etkilerini azaltmada da görevler alır ve böylece yine kollajen sentezini de azaltır. Yapılan klinik araştırmalarda bu sitokinin doz bağımlı olarak düşük konsantrasyonlarda uygulandığında keloid skar, pulmoner fibrozis, skleroderma, hepatik fibrozis gibi hastalıklarda fibrogenezi baskıladığı gösterilmiş ve bu hastalıkların tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Ayrıca bu sitokinin düşük dozda lokal uygulanması sonrası peridural fibrozisi belirgin düzeyde azalttığı da deneysel olarak gösterilmiştir (26, 52).

Bizim çalışmamızın sonuçları incelendiğinde TNF- α düzeylerinin gruplar arasında farklılık oluşturmadığı saptandı. Bilindiği üzere bu sitokin akut faz reaktanı olup deney modelimiz altı haftalık bir kronik dönemi içerdiğinden bu sitokin ekspresyonun farklılık oluşturmadığı düşünüldü. Diğer yandan IFN- γ gen ekspresyon düzeyleri hiçbir grupta ölçülemedi. Burada kullanılan bariyerlerin kronik inflamatuvar sürecin peridural alana uzanmasını engelleyerek bu sitokinin oluşumunu indirekt yoldan baskıladığı düşünüldü. Ancak SHAM grubunda da bu sitokinin ölçülememiş olması çalışılan kitin özelliğinin bu çalışmaya uygun olmadığı ya da yetersiz olabileceği yönünde değerlendirildi. TGF-1 β düzeylerine bakıldığında ise cerrahi girişim yapılmış tüm gruplarla KONTROL grubu arasında doku TGF-1 β düzeylerinin istatistiksel yönden farklı olmadığı saptandı. Oysa sayısal verilere bakıldığında PEG ve PRP grubuna ait sonuçların KONTROL grubu verilerine yakın düzeyde olduğu, SHAM ve HAS grubu sonuçlarının ise KONTROL grubu verilerine göre belirgin ve benzer düzeyde yüksek olduğu gözlemlendi. Diğer yandan istatistiksel olarak SHAM ile PEG ve yine SHAM ile PRP grubu verileri arasında farklılık olduğu gözlemlendi. Bu bulgularla PEG ve PRP isimli etken maddelerin cerrahi dokuda TGF-1 β

düzeylelerini belirgin ve benzer şekilde azaltabildiği ve nerede ise normal doku sınırlarına yaklaştırabildiği gözlendi. KONTROL grubu verileri dışarıda bırakılarak yapılan analizlerde de bu sonucun değişmediği saptandı. Sonuç olarak PEG ve PRP isimli etken maddelerin peridural fibrozis oluşumunda etkili olan TGF-1 β düzeylelerini belirgin ve benzer şekilde azaltabildiği; hyaluronik asidin ise bu birikimi etkileyemediği düşünöldü. Kollajen tip 1 gen ekspresyon analizi sonuçlarına bakıldığında sadece SHAM ile PRP grupları arasında farklılık olduğu saptandı. Grupların ortanca değerlerine bakıldığında ise her üç etken maddenin de sayısal olarak kolajen tip1 değerlerini azaltabildiği ve nerede ise normal doku düzeylelerine kadar indirebildiği gözlendi. Yine de istatistiksel analiz sonuçları ışığında sadece PRP isimli etken maddenin kollajen tip 1 düzeylelerini azaltabildiği kabul edildi. Diğer yandan KONTROL grubu verileri dışarıda bırakılıp analizler tekrar yapıldığında PEG ve PRP isimli etken maddelerin ratlarda cerrahi yapılan alanda peridural fibrozis oluşumunda etkili olan kollajen tip 1 düzeylelerini belirgin ve benzer düzeyde azaltabildiği gözlendi. Cerrahi alanda kollajen tip 3 oluşumu bakımından gruplar arasında her ne kadar istatistiksel yönden farklılık olmadığı gözlenmiş olsa da sayısal verilere bakıldığında SHAM grubu verilerinin diğer gruplara göre belirgin yüksek olduğu gözlendi. İstatistiksel yönden ise PEG ve PRP isimli etken maddelerin cerrahi alanda kollajen tip 3 oluşumunu benzer ve belirgin düzeyde azaltabildiği ve normal doku sınırlarına yaklaştırabildiği gözlendi. Hyaluronik asidin ise bu etkiye sahip olamadığı tespit edildi. KONTROL grubu verileri dışlanarak yapılan analizlerde de yukarıda elde edilen sonuçların değişmediği saptandı. Sonuç olarak PEG ve PRP isimli etken maddelerin peridural fibrozis oluşumunda etkili olan kollajen tip 3 birikimini ratlarda belirgin ve benzer şekilde azaltabildiği hyaluronik asidin ise bu birikimi etkileyemediği düşünöldü.

5.3. Çalışmanın limitasyonları

Bu deneysel çalışmanın birkaç yönden kısıtlılıkları vardır:

- Bu çalışmada elde edilen dokuların immunhistokimyasal ve diğer ileri düzey histopatolojik analizleri (floresan mikroskopi gibi) finansal yetersizlikler nedeni ile yapılamamıştır.
- Yine finansal yetersizlik nedeni ile ileri düzey biyokimyasal analiz yöntemleri (western blood, ELISA gibi) kullanılarak bu çalışmanın sonuçları desteklenememiştir.
- Çalışma sonuçları teknik ve finansal yetersizlikler nedeni ile ultrastrüktürel yönden (elektron mikroskopisi) ayrıntılı analize de tabi tutulamamıştır.
- Cilde ait yara yerinde ve cilt altındaki fasya ve adale gruplarında yara iyileşmesi sonrası oluşan tensil (gerilme) güçlerin düzeyi fiziksel yöntemler kullanılarak test edilememiştir. Bu nedenle de bu etken maddelerin yara iyileşmesindeki tensil güçlere ait etkileri ortaya konamamıştır.
- Ayrıca uygulanan deneysel model gereği bu etken maddelerin yara yerinde oluşabilecek dural BOS kaçakları üzerine olan durdurucu etkileri de analiz edilmemiştir
- Deneyin uygulandığı hayvanlara ötenazi öncesi motor aktiviteyi değerlendirmeye yönelik testler uygulanmamıştır.
- Deneyde peridural fibrozisi göstermeye yönelik radyolojik görüntüleme yöntemleri kullanılmamıştır.

6. SONUÇLAR

Bu deneysel çalışma sonunda aşağıdaki özet sonuçlara ulaşılmıştır:

1. PEG ve PRP isimli etken maddelerinin peridural fibrozisi normal doku düzeyine yaklaştırmasa da salt cerrahi yapılan dokuya göre belirgin ve benzer düzeyde azalttığı gözlemlendi.
2. Hyaluronik asit, PEG ve PRP isimli etken maddelerin cerrahi yapılan alanda damarlanmayı belirgin ve benzer düzeyde azaltabildiği sonucuna ulaşıldı.
3. Hyaluronik asit, PEG ve PRP isimli etken maddelerin cerrahi alana fibroblast göçünü belirgin ve benzer düzeyde engelleyebildiği tespit edildi.
4. PEG ve PRP isimli etken maddelerin cerrahi yapılan alanda peridural fibrozis oluşumunda etkili olan kollajen tip1 düzeylerini belirgin ve benzer düzeyde azaltabildiği gözlemlendi.
5. PEG ve PRP isimli etken maddelerin peridural fibrozis oluşumunda etkili olan kollajen tip 3 birikimini belirgin ve benzer şekilde azaltabildiği hyaluronik asidin ise bu birikimi etkileyemediği düşünüldü.
6. PEG ve PRP isimli etken maddelerin peridural fibrozis oluşumunda etkili olan TGF-1 β düzeylerini belirgin ve benzer şekilde azaltabildiği hyaluronik asidin ise bu birikimi etkileyemediği düşünüldü.
7. Hyaluronik asit, PEG ve PRP isimli etken maddelerin cerrahi alana fibroblast göçünü sağlayan sitokinlerden biri olan TNF- α düzeyleri üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığı gözlemlendi.
8. Hiç bir grupta cerrahi yapılan alanda peridural fibrozis oluşumunda etkili olan IFN- γ isimli sitokin PCR gen ekspresyon analiz sonucu elde edilemedi.

Sonuç olarak PEG ve PRP isimli deneysel farmakolojik ajanların ratlarda oluşturulan laminektomi modelinde peridural fibrozis oluşumunu normal doku düzeyine yaklaştırmasa da salt cerrahi yapılan dokuya göre belirgin ve benzer düzeyde azalttığı gözlemlendi. Bu

bulgularla bu etken maddelerin klinikte hastalar üzerinde kullanımının faydalı olabileceği düşünöldü. İlaveten her iki etken maddenin de hem doku uyumlu olması, hem nörotoksik olmaması ve hem de steril olması (virus yada prion aktarımı olmaması) klinikte kullanılabilmesi yönünden üstün avantajları olarak değeriendirildi. Ayrıca PEG isimli etken maddenin her ne kadar ekonomik yönden pahalı bir madde olsa da dura yaralanmalarında BOS kaçaklarını engelleyebilecek özelliklere sahip olması da bir üstünlük olarak değeriendirildi. Öte yandan PRP isimli etken maddenin hastanın kendi kanından hazırlanacak olması ve daha ucuz, ekonomik ve kolay hazırlanıp kolay uygulanabilir olması bu etken maddenin üstün özellikleri şeklinde düşünöldü.

Ayrıca bu çalışmanın sonuçları ve sahip olduğu limitasyonları ışığında bu farmakolojik ajanların klinikte uygulanması öncesinde daha büyük denek popülasyonu kullanılarak ileri düzey histopatolojik (immünohistokimyasal inceleme, elektron mikroskopik inceleme), biyokimyasal (sitokin düzeyleri, ekstrasellöler matriks yapısal analizi) ve moleköler biyolojik inceleme (genetik analiz ve gen ekspresyon analizi) yöntemleri ile daha detaylı incelenmesi gerektiği de düşünöldü.

KAYNAKLAR

1. Aghabeigi B. The pathophysiology of pain. *Br Dent J.* 1992; 173(3): 91-97.
2. Akeson WH, Massie JB, Huang B, Giurea A, Sah R, Garfin SR, Kim CW. Topical high-molecular-weight hyaluronan and a roofing barrier sheet equally inhibit postlaminectomy fibrosis. *Spine J* 2005; 5(2): 180-90
3. Alkalay RN, Kim DH, Urry DW, Xu J, Parker TM, Glazer PA. Prevention of postlaminectomy epidural fibrosis using bioelastic materials. *Spine (Phila Pa 1976).* 2003; 28(15): 1659-1665.
4. Bao F, Chen Y, Dekaban GA, Weaver LC. An anti-CD11d integrin antibody reduces cyclooxygenase-2 expression and protein and DNA oxidation after spinal cord injury in rats. *J Neurochem* 2004; 90(5): 1194-204
5. Baum CL, Arpey CJ. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg* 2005; 31(6): 674-686.
6. Bayat A, Bock O, Mrowietz U, Ollier WE, Ferguson MW. Genetic susceptibility to keloid disease and hypertrophic scarring: transforming growth factor beta1 common polymorphisms and plasma levels. *Plast Reconstr Surg.* 2003; 111(2): 535- 546.
7. Benoist M, Ficat C, Baraf P, Cauchoix J. Postoperative lumbar epiduroaracnoiditis. *Spine* 1994; 5(5): 432-436.
8. Bevilacqua MP, Nelson RM, Mannori G, Cecconi O. Endothelial-leucocyte adhesion molecules in human disease. *Annu Rev Med* 1994; 45: 361-378.
9. Bienvenu J. Exploration of cytokines in biological fluids. *CR Seances Soc Biol Fil* 1995; 189(55): 545.
10. Bronson RE, Argenta JG, Bertolami CN. Interleukin-1-induced changes in extracellular glycosaminoglycan composition of cutaneous scar-derived fibroblasts in culture. *Coll Relat Res* 1988; 8(3): 199-208.

11. Broughton G, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117(7 Suppl): 1-32.
12. Bryant MS, Bremer AM, Nyugen TQ. Autogeneic fat transplants in the epidural space in routine lumbar spine: MR imaging assesment. *AJNR* 1988; 9: 169-178.
13. Buck M, Houglum K, Chojkier M. Tumor necrosis factor-alpha inhibits collagen alpha1(I) gene expression and wound healing in a murine model of cachexia. *Am J Pathol* 1996; 149(1): 195-204.
14. Burton CV, Kirkaldy-willis WH, Young-Hing K, Heithoff KB. Causes of failure of surgery on the lumbar spine. *Clin Orthop* 1981; 157: 191-199.
15. Caner H, Atalay B. Başarısız bel cerrahisi sendromu. Zileli M, Özer AF (editörler), *Omurilik ve Omurga cerrahisi. 2. Baskı. İzmir, Meta Basım, 2002: 789-795.*
16. Cekinmez M, Erdogan B, Tufan K, Sarica FB, Ozen O, Caner H. Is topical tissue plasminogen activator application effective on prevention of the post-laminectomy epidural fibrosis? An experimental study. *Neurological Research* 2009; 31: 322-326
17. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *British Med Bulletin* 1993; 93(49): 481.
18. Chen WYJ, Abatangelo G. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Rep Reg* 1999; 7: 79-89
19. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Inflammation and repair. *Pathologic basis of disease. Philadelphia, WB Saunders Comp, 1994: 51-92.*
20. Damjanov I, Linder J: *Inflamation and Regeneration: Anderson' s Pathology Tenth Edition. Philadelphia, Mosby, 1996: 387-416.*
21. De Tribolet N, Porchet F, Lutz TW, Gratzl O, Brotchi J, van Alphen HA, van AckerRE, Benini A, Strommer KN, Bemays RL, Goffin J, Beuls EA, Ross JS. Clinical assessment of a novel antiadhesion barrier gel: Prospective, randomized, multicenter, clinical trial of ADCON-L to inhibit postoperative peridural fibrosis and related symptoms after lumbar discectomy. *Am J Orthop* 1998; 27(2):111-120

22. Dincel GC, Atmaca HT. Increased expressions of ADAMTS-13 and apoptosis contribute to neuropathology during *Toxoplasma gondii* encephalitis in mice. *Neuropathology*. 2015 Nov 6. doi: 10.1111/neup.12263. [Epub ahead of print]
23. diZerega GS, Cortese S, Rodgers KE, Block KM, Falcone SJ, Juarez TG, Berg R. A modern biomaterial for adhesion prevention. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007; 81(1): 239-50
24. Einhaus SL, Robertson JT, Dohan FCJ, Wujek JR, Ahmad S: Reduction of peridural fibrosis after lumbar laminotomy and discectomy in dogs by a resorbable gel Adcon-L. *Spine* 1997; 22: 1440-1447.
25. Enlace WA, Ramage EA, Lamp D, Howie SE: A type 2 (Th2 like) pattern of immune response predominates in the pulmonary interstitium of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis (CFA). *Clin Exp Immunol* 1995; 101: 436-441.
26. Emmez H, Kardes O, Dogulu F, Kurt G, Memis L, Baykaner MK. Role of antifibrotic cytokine interferon-gamma in the prevention of postlaminectomy peridural fibrosis in rats. *Neurosurgery* 2008; 62(6): 1351-1358
27. Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton M. Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg* 2006; 118(6): 147e-159e
28. Fager C, Freidberg SR. Analysis of Failures and Poor Results of Lumbar Spine Surgery. *Spine* 1980; 5(1): 87-94.
29. Feldmann M, Brennan FM. Cytokines and disease. Oppenheim JJ, Feldmann M (eds). *Cytokine Reference*. San Diego, Academic Press, 2001: 35-51.
30. Feldmann M, Male D: Cell cooperation in the immune response. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology Second Edition*. London, Churchill Livingstone, 1991: 1-8.
31. Fisher C, Gilbertson-Beadling S, Powers EA, Petzold G, Poorman R, Mitchell MA. Interstitial collagenase is required for angiogenesis in vitro. *Dev Biol* 1994; 162(2): 499-510.

32. Geisler FH. Prevention of epidural fibrosis: current methodologies. *Neurological Research* 1999; 21(1): 9-22.
33. Gerszten PC, Moossy JJ. Inhibition of peridural fibrosis after laminectomy using low-dose external beam radiation in a dog model. *Neurosurgery* 2000; 46(6): 1478-1485.
34. Gorgulu A, Simsek O, Cobanoglu S, Imer M, Turgay P. The effect of epidural free fat graft on the outcome of lumbar disc surgery. *Neurosurgical Review* 2004; 27(3): 181-184.
35. Gurtner G. Wound healing in normal and abnormal. *Grabb and Smith's Plastic Surgery*. Philadelphia, Lippincott-Raven, 2007: 15-22.
36. Haughton VM, Nyugen CM, Ho KC. The etiology of focal spinal arachnoiditis: an experimental study. *Spine* 1993; 18(9): 1193-1198.
37. Honghai X, Peng, Mengting, Cong L, Zhengming S, Xiong G, Yuelin Z. CCN2 and CCN5 exerts opposing effect on fibroblast proliferation and transdifferentiation induced by TGF- β . *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2015; 42: 1207-1219
38. Hoyland JA, Freemont AJ, Denton J, Thomas AMC, McMillian JJ, Jasyon MIV. Retained surgical swab debris in post-laminectomy arachnoiditis and peridural fibrosis. *J Bone Joint Surg (Br)* 1988; 70-b: 659-662.
39. Jayson MIV. The role of vascular damage and fibrosis in the pathogenesis of nerve root damage. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1992; 279: 40-48.
40. Jayson MIV: *The lumbar spine and back pain* 84th edition. Edinburgh, Churchill-Livingstone, 1992: 101-109.
41. Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan in Tissue Injury and Repair. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2007; 23: 435-61
42. Jönsson BO, Strömqvist B. Repeat Decompression of lumbar Nerve Roots. A Prospective Two-year Evaluation. *J Bone joint Surg (Br)* 1993; 75-b(6): 894-897.

43. Kato T, Haro H, Komori H, Shinomiya K. Evaluation of hyaluronic acid sheet for the prevention of postlaminectomy adhesions. *The Spine Journal* 2005; 5(5): 479-488
44. Kemaloglu S, Ozkan U, Yilmaz F, Nas K, Gur A, Acemoglu H, Karasu H, Cakmak E. Prevention of spinal epidural fibrosis by recombinant tissue plasminogen activator in rats. *Spinal Cord* 2003; 41: 427-431.
45. Kessel G, Bocher-Schwarz HG, Schwarz M. Use of ADCON-L to prevent peridural fibrosis following re-operation for recurrent lumbar radiculopathy: clinical results. *Minim Invasive Neurosurg* 2002; 45(3): 129-31
46. Kohyama T, Ertl RF, Valenti V, Spurzem J, Kawamoto M, Nakamura Y, Veys T, Allegra L, Romberger D, Rennard SI. Prostaglandin E(2) inhibits fibroblast chemotaxis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281(5): L1257-63
47. Kuby J. *Immunology*. W.H. Freeman and Company, 1992: 245.
48. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. *Acute and chronic inflammation, repair: cell regeneration, fibrosis and wound healing*. Basic Pathology Sixth Edition. Philadelphia, WB Saunders Company, 2000: 25-60.
49. Kurt G, Aytar MH, Dogulu F, Cemil B, Erdem O, Baykaner MK, Ceviker N. A comparison of the local effectiveness of mitomycin C, aprotinin, and Adcon-L in experimental peridural fibrosis. *Surg Neurol*. 2008; 70(6):608- 613
50. Ladin DA, Hou Z, Patel D, McPhail M, Olson JC, Saed GM, Fivenson DP. p53 and apoptosis alterations in keloids and keloid fibroblasts. *Wound Repair Regen* 1998; 6(1): 28-37.
51. Lawrence WT. Physiology of the acute wound. *Clin Plast Surg* 1998; 25(3): 321-40.
52. Leask A, Abraham DJ. TGF- β signaling and the fibrotic response. *The FASEB Journal* 2004; 18: 816-827

53. Li C, Wang H, Liu H, Yin J, Cui L, Chen Z. The prevention effect of poly (L-glutamic acid)/chitosan on spinal epidural fibrosis and peridural adhesion in the post-laminectomy rabbit model. *Eur Spine J* 2014; 23(11): 2423-31
54. Lichtenstein IL, Herzikoff S, Shore JM, Jiron MW, Stuart S, Mizuno L: The Dynamics of wound healing. *Surg Gynecol and Obstet* 1970; 130(4): 685-690.
55. Liu J, Ni B, Zhu L, Yang J, Cao X, Zhou W. Mitomycin C-polyethylene glycol controlled-release film inhibits collagen secretion and induces apoptosis of fibroblasts in the early wound of a postlaminectomy rat model. *Spine J* 2010; 10(5): 441-447.
56. Lladó A, Sologastua E, Guimerá J, Marín M. Expanded polytetrafluoroethylene membrane for the prevention of peridural fibrosis after spinal surgery: a clinical study. *Eur Spine J* 1999; 8(2): 144-150.
57. Longaker MT, Chiu ES, Harrison MR, Crombleholme TM, Langer JC, Duncan BW, Adzick NS, Verrier ED, Stern R. Studies in fetal wound healing. IV. Hyaluronic acid-stimulating activity distinguishes fetal wound fluid from adult wound fluid. *Ann Surg* 1989; 210(5): 667-72.
58. Madden JW, Arem AJ. Wound healing. Sabiston DC. *Textbook of Surgery Fourteenth Edition*. Philadelphia, WB Saunders, 1991: 164-175.
59. Mahato RI. *Biomaterials for delivery and targeting of proteins and nucleic acids*. CRC Press, 2005.
60. Male D, Roitt I: Adaptive and innate immunity. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology Second Edition*. London, Churchill Livingstone, 1991: 1-9.
61. Mitchell RN, Cotran RS. Akut ve kronik inflamasyon. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. *Temel Patoloji 6. Baskı*. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2000: 25-46.
62. Mitchell RN, Cotran RS. Onarım: Hücre rejenerasyonu, fibrosis ve yara iyileşmesi. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. *Temel Patoloji 6. Baskı*. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2000: 47-59.

63. Monaco JL, Lawrence WT. Acute wound healing an overview. *Clin Plast Surg* 2003; 30(1): 1-12.
64. Mullington JM, Hinze-Selch D, Pollmavhar T. Mediators of inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 933(10): 201.
65. Mussano F, Genova T, Munaron L, Petrillo S, Erovigni F, Carossa S. Cytokine, chemokine, and growth factor profile of platelet-rich plasma. *Platelets* 2016; 7: 1-5
66. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274(31): 21491-4.
67. Nakano M, Matsui H, Miaki K, Yamagami T, Tsuji H. Postlaminectomy adhesion of the cauda equina. changes of postoperative vascular permeability of the equina in rats. *Spine* 1997; 22(10): 1105-1114.
68. Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2011; 105 (Suppl 1): S13–S33
69. Ozveren MF, Turkmen CS, Tanik C, Ziyal IM, Erol FS. Use of expanded polytetrafluoroethylene grafts in the prevention of peridural fibrosis: an experimental study. *Turkish Neurosurgery* 2011; 11: 32 – 37.
70. Petrie JL, Ross JS. Use of ADCON-L to inhibit postoperative fibrosis and related symptoms following lumbar disc surgery: a preliminary report. *Eur Spine J (Suppl 1)* 1996; 5: 10-17
71. Pospiech J, Pajonk F, Stolke D. Epidural scar tissue formation after spinal surgery: an experimental study. *Eur Spine* 1995; 4: 213-219.
72. Preul MC, Campbell PK, Bichard WD, Spetzler RF. Application of a hydrogel sealant improves watertight closures of duraplasty onlay grafts in a canine craniotomy model. *J Neurosurg* 2007; 107(3): 642-50
73. Preul MC, Campbell PK, Garlick DS, Spetzler RF. Application of a new hydrogel dural sealant that reduces epidural adhesion formation: evaluation in a large animal laminectomy model. *J Neurosurg Spine* 2010; 12(4): 381-90

74. Price RD, Berry MG, Navsaria HA. Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2007; 60(10): 1110-1119.
75. Prusick VR, Lint DS, Bruder J. Cauda Equina Syndrome as a complication of free epidural fat grafting. *J Bone Joint Surg* 1988; 70-A(8): 1256-1258.
76. Richter HP, Kast E, Tomczak R, Besenfelder W, Gaus W. Results of applying ADCON-L gel after lumbar discectomy: the German ADCON-L study. *J Neurosurg* 2001; 95(2 Suppl): 179-89.
77. Robbins SL, Kumar V. İltihap ve onarım. Uluoglu O. *Patoloji Dördüncü Baskı*. Philadelphia, WB Saunders, 1990: 32-75.
78. Robertson JT, Meric AL, Dohan CF, Schweitzer JB, Wujek JR, Ahmad S. The reduction of postlaminectomy peridural fibrosis in by a carbohydrate polymer. *J Neurosurg* 1993; 79: 89-95
79. Robertson JT, Petrie JL, Frederickson RCA, De Tribolet N, Hardy R. Adcon-L symposium. Round table discussion. *Eur Spine J (Suppl 1)* 1996; 5: 26-28
80. Samy AM, Hardy RW. Epidural fibrosis and the failed back surgery syndrome: history and physical findings. *Neurol Res* 1999; 21(1): 55-58.
81. Urioste SS, Arndt KA, Dover JS. Keloids and hypertrophic scars: review and treatment strategies. *Semin Cutan Med Surg.* 1999; 18(2): 159-171.
82. Schimizzi AL, Massie JB, Murphy M, Perry A, Kim CW, Garfin SR, Akeson WH. High-molecular-weight hyaluronan inhibits macrophage proliferation and cytokine release in the early wound of a preclinical postlaminectomy rat model. *Spine J* 2006; 6(5): 550-6.
83. Schwicker D. Cost effectiveness of lumbar disc surgery and of a preventive treatment for peridural fibrosis. *Eur Spine J* 1996; 5(1): 21-25.
84. Simpson DM, Ross R. The neutrophilic leukocyte in wound repair a study with antineutrophil serum. *J Clin Invest* 1972; 51(8): 2009-2023.

85. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999; 341(10): 738-746.
86. Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin Endoperoxide H Synthases (Cyclooxygenases) -1 and -2. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271 (52): 33157-33160
87. Soo C. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue-derived inhibitors in cutaneous wound repair--a correction. *Plast Reconstr Surg* 2000; 106(1): 236-7.
88. Szulgit G, Rudolph R, Wandel A, Tenenhaus M, Panos R, Gardner H. Alterations in fibroblast alpha1beta1 integrin collagen receptor expression in keloids and hypertrophic scars. *J Invest Dermatol* 2002; 118(3): 409-415.
89. Temel SG, Ozturk C, Temiz A, Ersozlu S, Aydinli U. A new material for prevention of epidural fibrosis after laminectomy. *J Spinal Disord Tech* 2006; 19: 270-275.
90. Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(7): 528-539
91. Topsakal C, Akpolat N, Erol FS, Ozveren MF, Akdemir I, Kaplan M, Tiftikci M, Kilic N. Seprafilm superior to Gore-Tex in the prevention of peridural fibrosis. *J Neurosurg* 2004; 101(2): 295-302.
92. Tuan TL, Zhu JY, Sun B, Nichter LS, Nimni ME, Laug WE. Elevated levels of plasminogen activator inhibitor-1 may account for the altered fibrinolysis by keloid fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1996; 106(5): 1007-1011
93. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenase-1 and -2. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 1998; 38: 97-120
94. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003; 83(3): 835-870
95. XiYang Y, Lu B, Zhao Y, Zhang Y, Xia Q, Zou Y, Zhang W, Quan X, Liu S, McDonald JW, Zhang L, Wang T. Expressional difference, distributions of TGF- β 1

in TGF- β 1 knock down transgenic mouse, and its possible roles in injured spinal cord. *Experimental Biology and Medicine* 2014; 239: 320–329.

96. Young WF, Jallo J. Failed back surgery syndrome. *Contemporary Neurosurgery* 1993; 15(21): 1-6.
97. Yuan J, Zou M, Xiang X, Zhu H, Chu W, Liu W, Chen F, Lin J. Curcumin improves neural function after spinal cord injury by the joint inhibition of the intracellular and extracellular components of glial scar. *J Surg Research* 2015; 195: 325-245
98. Zeinalizadeh M, Miri SM, Ardalan FA, Maleki F, Zakeri M, Aghajanzadeh E, Habibi Z. Reduction of epidural fibrosis and dural adhesions after lamina reconstruction by absorbable cement: an experimental study. *Spine J* 2014; 14(1): 113-8