

T.C.  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

**POSTERİOR SPİNAL FÜZYONDA  
AMNİYON SIVISININ ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Metehan SARAÇOĞLU

TRABZON - 2008

T.C.  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

**POSTERİOR SPİNAL FÜZYONDA  
AMNİYON SIVISININ ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Metehan SARAÇOĞLU

Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Hafız AYDIN

**TRABZON - 2008**

## İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
KISALTMALAR .....	ii
GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
MATERYAL VE METOD .....	12
BULGULAR .....	19
TARTIŞMA.....	26
SONUÇLAR.....	31
ÖZET .....	32
SUMMARY .....	33
KAYNAKLAR.....	34

## KISALTMALAR

- TGF : Transforme edici büyüme faktörü  
FGF : Fibroblast büyüme aktörü  
PDGF : Trombosit aktive edici büyüme faktörü  
EGF : Epidermal büyüme faktörü  
BMP : Kemik morfojenik protein  
IGF : İnsülin benzeri büyüme faktörü  
HA : Hiyaluronik asit  
HASA : Hiyaluronik asit stimüle edici faktör

## GİRİŞ VE AMAÇ

Vertebra cerrahisi; omurga instabilitelerinin tedavisi, omurga deformitelerinin düzeltilmesi ve ilerlemesini önlemek amacıyla sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (1). Vertebra cerrahisinin başarısı için füzyon oldukça önemlidir. Son yıllardaki vertebra cerrahisindeki gelişmeler, füzyonun önemini gitgide arttırmaktadır.

Vertebralarda füzyonu oluşturmak için, biyolojik ve mekanik faktörlere ihtiyaç vardır. Biyolojik faktörler; eklem kıkırdağının çıkarılması, dekortikasyon, greftleme ve füzyon uygulanan bölgenin hareketsiz bırakılmasıdır. Mekanik faktörler ise; vertebraı tespit için kullanılan rot, plak, tel, kanca, alçı, korse ve cihaz gibi tespit araçlarıdır. Mekanik faktörler füzyonu kolaylaştırmakla beraber, biyolojik faktörler olmaksızın tek başlarına füzyon oluşturamazlar (2).

Füzyonda en sık karşılaşılan komplikasyonlardan birisi, psödoartrozdur (2). Literatürde %5-35 arasında değişen oranlarda psödoartroz bildirilmiştir. Füzyonun sağlam internal tespit ile mekanik olarak güçlendirilmesi, psödoartroz oluşmasını tamamen ortadan kaldırmaz. Bu yüzden biyolojik faktörler giderek önem kazanmaktadır (2). Bunun yanında, biyolojik faktörlerden; özellikle kemik greftlerinin klinik düzeyde alternatiflerinin araştırılması için çalışmalar yapılmaktadır (2). Bu çalışmaların amacı, vertebralarda yapılan füzyonda kemik greftlerine olan ihtiyacın en düşük seviyeye indirilmesidir. Bu amaçla; kemik üzerine anabolik etkisinin olduğunu bildiğimiz mediatörler kullanılır (3). Bu mediatörler, kırıklardan sonra ortaya çıkan transforme edici büyüme faktörü (TGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), interlökin-1 ve 6 dır (4,5). İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF-I, IGF-II) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) de büyüme ve trofik faktörlerdendir. Bu faktörlerden FGF, osteoblastlar üzerinde anjiogenetik ve mitojenik aktiviteye sahiptir (5-7). TGF- $\beta$ 1, kemik defektlerinin iyileşmesini olumlu yönde etkiler (8). IGF I-II, kemik iyileşmesindeki matriksi sentezleyen büyüme faktörleridir (9). EGF, in vitro fibroblastlara ve çeşitli epitel hücrelerine mitojenik etkilidir (10).

Literatürde; amniyon sıvısının EGF, IGF I-II, FGF, fibronektin ve laminin gibi ekstrasellüler makromoleküllerden zengin olduğu bildirilmiştir (8,9,10,11). Bu faktörlerin yanı sıra, amniyon sıvısı hiyaluronik asit (HA) gibi vücut sıvılarında ve bağ dokuda bolca bulunan yüksek molekül ağırlıklı polisakkaridi, kondroitin sülfat, keratan sülfat ve hiyaluronik asidi aktive edici faktörü (HASA) de içermektedir (8,11). HA, hücre farklılaşmasında, hücre hareketinde, hücrelerin yapışmasında rol oynayan, antiinflamatuvar özellikleri olan bir polisakkarittir (12). Osteoblastik kemik oluşumunu arttırıcı etkisi de vardır (8). Hiyaluronik asidin; mezenkimal hücre farklılaşmasını arttırarak, yeni kemik oluşumunu arttırma kapasitesine sahip olduğu da literatürde bildirilmiştir (13,14).

Bu çalışmada; literatürde füzyon sağlamak amacıyla kullanılan maddelerin maliyetinin yüksekliği ve teminindeki zorluklar nedeniyle, amniyon sıvısının bu maddelere alternatif olup olmayacağını araştırmayı amaçladık.

## GENEL BİLGİLER

Vertebra cerrahisinde füzyon, eklemi oluşturan kemik uçlarındaki kırık yüzleri çıkararak, ortaya çıkan yüzler arasında sıkı temas sağlayarak bunların kaynaşmasını sağlamaktır. Vertebra aralarında kemik köprü veya destek sütunlar oluşturarak vertebra blok halinde hareketsiz bırakma şeklinde de tanımlanmıştır (15). Füzyon; vertebra kırık ve çıkıklarında, disk çıkarılmasından sonra stabilite sağlamak için kullanılmıştır. Ayrıca skolyoz, kifoz, diastematomyeli, spina bifida, spondilolistezis ve diğer konjenital bozukluklarda, ankilozan spondilite omurgayı düzeltme amacıyla kullanılmıştır (15).

Kırık iyileşmesinin biyolojisi hakkında detaylı bilgi sahibi olunmasına rağmen, spinal füzyondaki kemikleşmenin nasıl kontrol edildiği moleküler düzeyde çok detaylı olarak bilinmemektedir (9). Boden ve arkadaşları; hayvan modellemesi yaparak, tavşanlarda intertransvers füzyonda otojen iliak grefti kullanmış ve hala geçerliliğini koruyan, spinal füzyonun histolojik evrelemesini öne sürmüştür (9).

Spinal füzyon; başlangıç (inflamatuvar) fazı, orta (tamir) faz ve son olarak da geç (yeniden şekillenme) faz olmak üzere 3 fazdan oluşmaktadır. Başlangıç aşamasında ya da başka ifadeyle inflamatuvar aşamada; dekortikasyondan dolayı oluşan hematoma, inflamatuvar hücrelerin akımına uğrar ve fibrovasküler bir stroma oluşur. Kemik morfojenik proteinleri 4 ve 6 (BMP-4, BMP-6), alkalik fosfatase ve osteonektin seviyeleri yükselir. Başlangıç fazı, 1-3 hafta sürmektedir. 4. ve 5. haftaya denk gelen orta faz veya tamir fazı; artmış yeniden damarlanmadan, nekrotik kemiğin rezorbsiyonundan, osteoblastik ve kondroblastik hücrelerin farklılaşmasından oluşur. Komşu transvers çıkıntılarda oluşan iki alanı birleştirmek üzere, ortada en kondral kemikleşme meydana gelir. Bu faz esnasında en çok osteokalsin ve osteopontin seviyeleri yükselir, ikinci yükselme ise BMP-6 seviyesinde olur. Geç faz veya yeniden şekillenme fazı ise 6. haftada başlar, 10. haftaya kadar sürer. Spinal füzyonun geç fazı, lateral transvers alanlarda daha hızlı oluşurken, merkezdeki alanlarda daha geç

oluşmaktadır. Lateralde oluşan kemik intramembranöz yapıda iken, merkezde oluşan kemik endokondral yapıdadır (9).

Omurgada başarılı bir füzyonun sağlanabilmesi için; mekanik, biyolojik ve biyofizik yöntemler kullanılmaktadır (9). Bu yöntemlerin içinde, otojen kemik greftlemesinden gen tedavisine kadar değişen çeşitli yöntemler vardır (Tablo 1) (9). Bu yöntemlerden hangisi kullanılırsa kullanılsın, vertebralardaki füzyona başarılı demek için, bir veya birkaç intervertebral hareket segmentinde klinik ve radyolojik olarak hareket kaybının ispatlanmış olması gerekmektedir. Vertebral füzyonun başarılı bir şekilde gerçekleşmesi, büyük oranda füzyon alanına konulan greft materyalinin özelliğine bağlıdır. Kemik greftlerinin davranış şekillerinin açıklamaları Tablo-2'de verilmiştir. Kullanılan greftin kaynağı, tipi, hazırlanma tekniği gibi kemik greftine bağlı faktörler ve sistemik hastalıkların varlığı, psikososyal durum gibi hastaya ait faktörler füzyon oluşumunu etkilediği gösterilmiştir (9).



**Tablo 1.** Spinal füzyonda kullanılan yöntemler

MEKANİK	internal tespit (vida, kanca, rod, vb) eksternal cihazlar
BİYOLOJİK	<p><b>KEMİK GREFT MATERYALLERİ:</b></p> <p>a) Otojen kemik greftleri: Kansellöz ve morselize Kortikal Kortikokansellöz</p> <p>b) Damarlı ve damarsız kortikal greft</p> <p>c) Allojenik kemik greftleri: Taze (fresh) Donmuş (frozen) Dondurulup kurutulmuş (Freeze-dried)</p> <p>d) Hücre temelli otojen greftler: Anfraksiyone taze kemik iliği Mezenşimal kök hücreler Genetik olarak değiştirilmiş hücreler Farklılaşmış osteoblastlar, kondrositler</p> <p><b>KEMİK GREFTİ GENİŞLETİCİLERİ</b></p> <p>a) Mineralize kemik matrisleri: Seramikler (kalsiyum fosfat, trikalsiyum fosfat, kalsiyum sülfat) Kollajen Kompozit greftler</p> <p>b) Bioaktif cam</p> <p>c) Sentetik polimerler</p> <p>d) Demineralize kemik matrisi (DBM)</p> <p><b>BÜYÜME FAKTÖRLERİ VE SİTOKİNLER</b></p> <p>a) Transforme edici büyüme faktörü-<math>\beta</math></p> <p>b) Kemik morfojenik proteinler (BMP)</p> <p>c) <math>\infty</math> ve <math>\beta</math> fibroblast büyüme faktörleri</p> <p>d) Trombosit türevi büyüme faktörleri</p> <p>e) İnsülin benzeri büyüme faktörleri</p> <p>f) Büyüme farklılaşma faktörleri</p> <p><b>GEN TEMELLİ TEDAVİ</b> Canlı içinde ve canlı dışında</p>
BİYOFİZİKSEL	Elektrik uyarması Ultrason uyarması

**Tablo 2.** Greft materyallerinin özellikleri

<b>Özellikler</b>	<b>Tanımlama</b>
<b>Osteojenik</b>	Doğrudan kemik oluşturma yeteneğine sahip hücreler içermesi
<b>Osteoindüktif</b>	Altta yatan dokudan pluripotent hücrelerin osteoblastik fenotipe farklılaşmasını indüklemeye yeteneği
<b>Osteokondüktif</b>	Kendi üzerinde kemik büyümesini destekleme özelliği
<b>Osteointegratif</b>	Araya giren fibröz doku olmaksızın kemik yüzeyine kimyasal olarak bağlanma özelliği
<b>Biyouygunluk</b>	Minimal immunolojik reaksiyon veya reaksiyon oluşturmaması
<b>Mekanik olarak stabil</b>	Kemik oluşumunu artırmak için erken yüklenme ve impaksiyona olanak sağlama
<b>Biyoemilebilir Modüler</b>	Yeniden şekillenebilme İdeal kemik greft yedekleri blok formda ve granüllü olarak bulunabilmeli(kullanım kolaylığı)
<b>Diğerleri</b>	Uygun maliyetli Hemen bulunabilir Yapısal olarak kemiğe benzer

### **Otojen Kemik Greftleri**

Kemik grefti hastanın kendisinden alınmıştır. Genel olarak tibia, fibula ve iliak kemik kullanılmıştır (9). Bu üç kemik kortikal ve spongiöz greft kaynağı olmakla beraber, bütün kemik olarak da kullanılmıştır. Kaburga da nadir de olsa bütün greft olarak kullanılmıştır (9). Vertebral füzyonda otojen kemik greftlemesi altın standarttır. Tam doku uyumlu olması, tamamen osteointegrasyona uğraması, verici bağımlı hastalık taşımaması ve bağışık yanıt oluşturmaması nedeniyle çok avantajlı olduğu belirtilmiştir (9). Bunun yanında, özellikle çocuklarda yeterli miktarda greft sağlanamayabilmesi, revizyon cerrahisinde greft kaynağının azalması ve çok seviyeli fiksasyonlarda miktar olarak yetersiz kalabilmesi de dezavantajları olmuştur. Otojen kemik greftleri de kendi arasında beş gruba ayrılır (9).

**a) Spongiöz otogreftler:** Başlangıçta çok az yapısal bütünlükleri vardır. İçerdiği bazı osteoblast ve osteositler erken kemik yapma potansiyeline sahiptir (9).

**b) Kortikal (destek) greftler:** Yapısal desteğin gerekli olduğu yerlerde kullanılmıştır. Kansellöz kemikten daha yoğun ve kompakt yapıda olup, vasküler giriş ve yeniden şekillenmeye ise dirençlidir (9).

**c) Morselize kortikal kemik greftleri:** Diğer greft materyallerinin hacmini arttırmak amacıyla kullanılmıştır (9).

**d) Otojen kortikokansellöz kemik:** Vertebral füzyonda en çok kullanılan grefttir. Kortikal kısmı, komponentlerin yapısal destek görevini yüklenirken, kansellöz kısmı osteojenik ve osteoindüktif özelliğini sağlar (9).

**e) Serbest vaskülarize kortikal greftler:** Alıcı yatağın beslenmesinin bozuk olduğu, daha önce cerrahi uygulanmış psödoartroz olgularında ve radyasyon nedeniyle fibrozis gelişmiş dokularda faydalıdır. Kaynama defekti 12cm.'den fazla olduğunda, bu greftler tercih edilmiştir (9).

### **Allojenik Kemik Greftleri**

Hasta dışındaki birisinden alınmış greft demektir. Sınırsız miktarda kullanıma uygun olmaları, çeşitli şekillerde hazırlanabilmeleri ve donör saha morbiditesi taşımamaları avantajları olmuştur (9). Dezavantajları ise; HIV, HBV, HCV gibi hastalıkları transfer etme ihtimallerinin olmasıdır (9).

### **Demineralize Kemik Matrisi (DBM)**

Klinik olarak femur ve tibia kırıklarının nonunionlarının tedavisinde otojen greftin etkisini güçlendirmek için kullanılmıştır (16).

Greftleme tekniğinin başarılı olması, vertebra cerrahisinde yeterli değildir. Bu cerrahinin temelini, füzyon oluşturur. Vertebra cerrahisinde kullanılan sistemler, füzyon sağlanıncaya kadar omurganın düzgün kalmasını sağlar ve ameliyat sonrası dışarıdan bir tespite gerek kalmadan erken harekete izin verirler (17). Vertebra cerrahisinde yapılan füzyonun çeşitli teknikleri vardır.

Bunlar:

- 1-Posterior füzyon
- 2- Posterolateral veya İntertransvers Füzyon
- 3- Lateral Füzyon
- 4- Anterior Füzyon
- 5- İnterbody Füzyon
- 6- Minimal İnvazif Anterior Füzyon

### **1. Posterior Füzyon**

Hibbs tarafından 1911 yılında ortaya atılan prensiplere dayanmaktadır. Omurganın arka elemanlarının füzyonudur (9). Dejeneratif omurga hastalıkları tedavisinde en sık kullanılan cerrahi yöntemdir (9). Bu hastalarda konservatif tedaviye göre ağrı

sağaltımında üstündür. Posterior orta hat veya Wiltse paravertebral yaklaşım ile yapılabilir (9).

Dezavantajları:

1-Psödoartroz insidansı posterolateral veya lateral füzyondan daha yüksektir.

2-Bu teknik sağlam lamina ve spinöz çıkıntı gerektirir ve bu nedenle posterior füzyonun öncüsü olan dekompresif laminektomi sonrasında kullanılamayabilir.

3-Füzyon sonrası stenoz oranı, diğer tekniklere göre yüksektir.

## **2. Posterolateral veya İntertransvers Füzyon**

Posterolateral füzyon psödoartroz onarımından başka, dejeneratif spondiloartrit de kullanılmıştır (9). Cerrahi komplikasyonu az olmasına rağmen, solid füzyon oluşma oranının yüksek olması dezavantajı olarak değerlendirilmiştir (15).

## **3. Lateral Füzyon**

Supraspinöz ve interspinöz ligamanlara zarar vermemesi tekniğin avantajı, orta hat posterior yaklaşımlarla kıyaslandığında apofizyal ekleme ulaşımın zor olması ise dezavantajı olmuştur (9).

## **4. Anterior Füzyon**

Anterior füzyon; vertebra cismi tümör rezeksiyonu ve kemik grefti yerleştirmek için yararlı teknik olmasına rağmen, posterior ve posterolateral yaklaşıma göre daha riskli ve zor olarak değerlendirilmiştir. Ameliyat sırasında kanama kontrolü zordur (15).

## **5. İnterbody Füzyon**

Servikal bölgede uygulandığında geçici ses kısıklığı ve yutma güçlüğü bilinen komplikasyonlarıdır. Ciddi komplikasyon olarak ise, karotid ve vertebral arter yaralanması bildirilmiştir (9).

## **6. Minimal İnvazif Anterior Füzyon**

Uzun bir öğrenme eğrisi gerektirmesi ve komplikasyonlarının fazlalığı nedeniyle deneyimli cerrahlar tarafından yapılması gerekmektedir (9).

Literatürde, vertebralarda füzyonu hızlandırmak için sistemik mediatörler ve ekstrasellüler matriks elemanları kullanılarak çalışmalar yapılmıştır (3). Çalışmalarda; kemik yapımını osteoindüktif moleküllerin (kemik morfojenik proteinleri gibi) arttırdığı belirtilmiştir (18). Kemik defektlerinin iyileşmesinin moleküler yapısı incelendiğinde; omurganın dekortikasyonundan sonra oluşan hematoma içindeki ve transplante edilen otojen kemik matriksi içindeki büyüme faktörleri osteoindüksiyonu başlatır. TGF- $\beta$  ailesi, BMP-2, BMP-9, büyüme ile farklılaşma faktörleri, kemik defektleri

iyileşmesindeki en önemli büyüme faktörleridir (9). Kallus içindeki diğer büyüme faktörleri ise, FGF, PDGF, IGF-I ve IGF-II'dir. Bu faktörler farklılaşmamış mezenşimal hücrelerin migrasyonunu tetikler ve bunlar proliferasyon olarak kemik yapan hücrelere dönüşürler (9). TGF- $\beta$  nın tek başına osteoindüksiyonu başlatma yeteneği yoktur. BMP ise, hücre dışı ve iskelet organogenezinden kemik rejenerasyonuna kadar geniş bir fonksiyona sahiptir. FGF, yeni damar oluşumu ve yara iyileşmesinde etkilidir. PDGF, kemik iyileşmesindeki trombüs oluşumundan sorumludur. IGF I-II, kemik iyileşmesindeki matriksi sentezleyen büyüme faktörleridir (9). Heparin sülfatlar, heparin bağlayıcı büyüme faktörleri, heparin sülfat proteoglikanları gibi ekstrasellüler matriks elemanlarının da kemik defektlerinin iyileşmesini olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir (8).

### **Amniyon Sıvısı**

Amniyon boşluğu, kısmen amniyon hücreleri tarafından oluşturulan fakat esas olarak anne kanından gelen berrak bir sıvı ile doludur. Amniyon sıvısının miktarı 10. haftada ortalama 30ml, 20. haftada 350 ml, 37. haftada 800-1000 ml şeklinde gebeliğin yaşıyla birlikte artar. Amniyon sıvısı içinde barındırdığı canlıyı dıştan gelen darbelerle karşı korur, embriyonun amniyon zarına yapışmasını önler ve fetusun hareket etmesine olanak sağlar

Gebeliğin erken aylarında embriyo, kendisine koruyucu bir yastık görevi yapan bu sıvı içinde göbek kordonu ile asılı halde bulunur. Amniyon sıvısındaki su her 3 saatte bir yenilenir. Bu yenilenme madde alışverişinin ne kadar fazla olduğunun göstergesidir (19).

Amniyon sıvısı, EGF, IGF I-II, FGF, fibronektin ve laminin gibi ekstrasellüler makromoleküllerden oldukça zengindir. Aynı zamanda amniyon sıvısı, HA ve HASA'dan da oldukça zengindir (8).

### **Hiyaluronik Asit (HA)**

Hiyaluronik asit; glukronik asit ve N-asetil glukozamin içeren disakkarit birimlerinin herhangi bir dallanma olmaksızın tekrarlanmasıyla oluşur. Bakterilerden, hayvanlara ve insanlara kadar uzanan birçok canlının yapısında bulunan bir glikozaminoglikandır. Amniyon sıvısı içeriğindeki glikozaminoglikanlar (mukopolisakkarit) birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Dahl, mukopolisakkaritlerin tüm konsantrasyonunun 0.8-60 mikrogram/mililitre( $\mu\text{g/ml}$ ) civarında olduğunu belirtmiştir (20). HA, vücutta tüm bağ dokunun ekstrasellüler

boşluklarında bulunan yüksek molekül ağırlıklı lineer bir polisakkarittir (21). Sinovial sıvı, vitröz sıvı ve göbek kordonundaki ana glikozaminoglikandır (22). HA konsantrasyonu, gestasyon sürecinde değişiklik gösterir (21). In vitro çalışmalarda, HA'in proteoglikan sentezi ve sekresyonunu arttırmak yoluyla kondrosit aktivitesini düzenlediği gösterilmiştir (8). Nötral formu olan hiyaluronat, matriksin organizasyonu, yara iyileşmesi, anjiogenez ve tümör metastazlarında rol oynar (22). HA; lenfosit migrasyonunu, proliferasyonunu, kemotaksisini, granülosit fagositozunu ve degranülasyonunu, makrofaj hareketini inhibe ederek skar gelişimini azaltmaktadır (8).

Amniyon sıvısı içeriğinde bulunan HASA, endojen HA üretimini arttırarak etki etmektedir (23).

EGF, in vitro fibroblastlara ve çeşitli epitel hücrelerine mitojenik etkilidir (10).

FGF, özellikle; hem in vivo hem in vitro yeni kan damarları oluşumunun (anjiogenezis) tüm basamakları için gereklidir (24).

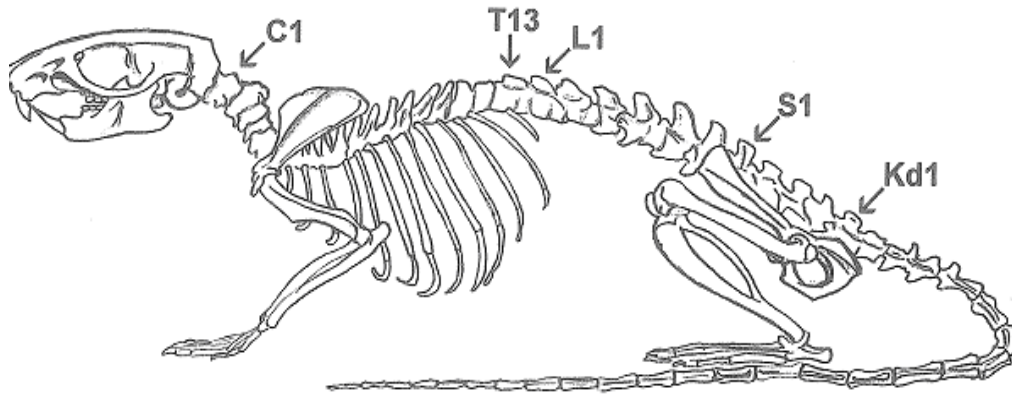
İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF I-II); büyümeyi uyarmada insülininden bile daha güçlü etkiye sahiptir (25). Amniyon sıvısındaki düzeylerinin, gestasyonun son haftalarında azaldığı bildirilmiştir (26).

Heparin bağlayıcı protein; epidermal büyüme faktör ailesinin bir üyesi olup, değişik organ injurilerinin iyileşmesinde rol oynadığı belirtilmiştir (27).

### **Rat Anatomisi**

Labaratuvar ratı tipik bir omurgalıdır. İskelet sistemi, aksiyal ve appendiküler bölümlere ayrılır. Aksiyel iskelet bölümü; kafatası, omurga, sternum ve kaburgaları içerirken, appendiküler iskelet bölümü ise; pektoral kavşak, üst ekstremitte, pelvis ve alt ekstremitteyi kapsar. Kemik olgunlaşması diğer memelilere göre ratlarda daha yavaştır. Vertebra epifizleri ve dirsek, tibia distali ve fibula dışındaki tüm periferik eklemler erişkin çağda bile kapanmaz. Vertebral kolon; 7 servikal, 13 torakal, 6 lumbal, 4 sakral, 27-30 arası değişen kaudal vertebradan oluşur. C7-T13-L6-S4-Kd27-30 şeklinde formülize edilmiştir (Resim 1). Spinal kord, erişkin erkek ratlarda 113-125 mm uzunlukta ve yaklaşık 0.7gr ağırlıktadır (28).

Ratın spinal kolonunun dolaşımı; abdominal aortun verdiği iliolumber dal tarafından düzenlenir. Spinal kordun venöz drenajı, uzunlamasına seyirli altı venöz kanaldan oluşur. Venöz pleksus ventralde dorsale göre daha geniş damarlardan oluşmaktadır (28).



Sıçan omurgalı hayvanların tipik bir örneğidir. **C1**: 1. servikal vertebra; **T13**: 13. torakal vertebra; **L1**: 1. lomber vertebra; **S1**: 1. sakral vertebra; **Kd 1**: 1. kaudal vertebra. Kaudal vertebraların sayıları sabittir (Hebel ve Stromberg, 1976).

**Resim 1.** Rat iskelet sistemi

## MATERYAL VE METOD

Bu deneysel çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma ve Uygulama Merkezi Labaratuvarında, 15.10.2007- 07.01.2008 tarihleri arasında yapıldı. Çalışmada, ortalama ağırlıkları 350gr (300-400gr) olan, 20 haftalık, 28 adet Spraque Dawley cinsi, erkek rat kullanıldı. Ratlar 12-12 saatlik ışık-karanlık siklusunda, 20-24°C'de, tek tek olacak şekilde kafeslere yerleştirildi. Ratlar, günlük 10gr rat yemi ve su ile beslendi. Çalışma süresinde, ratların kafesleri düzenli olarak 3 günde bir temizlendi. Ratlar, beslenmelerini takiben bir hafta sonra rastgele gruplara ayrıldı. Ratların, 14 tanesi kontrol grubu, 14 tanesi amniyon sıvısı uygulanacak grup olarak 2'ye ayrıldı. Gruplar, kendi içinde 3. ve 6. haftalarda değerlendirilmesi için, 7'şer rattan oluşan 2'şer gruba ayrıldı. Böylece 4 grup elde edildi. Gruplarda yapılan füzyonların sonuçlarının değerlendirilmesi, radyolojik ve histolojik olarak yapıldı.

Anestezi sağlamak amacıyla; ratlara xylazin hidroklorid (Rompun®; Bayer Healthcare, Leverkusen, Almanya) 10mg/kg dan intraperitoneal ve ketamin hidroklorid (Ketalar®; Pfizer, İstanbul, Türkiye) 30mg/kg dan intraperitoneal olarak yapıldı (Resim 2). Anestezi uygulanan ratlar, yüzüstü pozisyonda iken, cerrahi uygulanacak bölge traş edildi ve %10'luk povidon iyot solüsyonu (Batticon®; Adeka, Samsun, Türkiye) ile boyandı. Steril örtüler ile örtülerek steril saha elde edildi (Resim 3-4).





**Resim 2.** Ratlar sedatize edildi.



**Resim 3.** Ratlar ameliyat masasına yüzüstü yatırıldı.



**Resim 4.** Cerrahi uygulanacak bölge traş edildi ve antiseptik solüsyon ile boyanarak steril saha elde edildi.

Lumbal bölgeye spinöz çıkıntılar üzerinden olacak şekilde, orta hat cerrahi insizyonu yapıldı. Cilt, cilt altı ve fasya geçildikten sonra, ratların posteriorunda yer alan longissimus lumborum kası geçilerek spinöz çıkıntılar ve transvers çıkıntılar ortaya kondu. Lumbal vertebraların spinöz çıkıntıları ronger ile alınarak, kemikler yumuşak dokularından temizlendi ve otogreft olarak hazırlandı (Resim 5). Tüm ratlara ronger ile eşit kalınlıkta ve uzunlukta greft alınarak füzyon yapıldı.



**Resim 5.** Spinöz çıkıntılar ronger ile alındı

Greft konulacak olan lumbal bölge, küret ve ince burr ile temizlenerek dekortike edildi (Resim 6).



**Resim 6.** Greft konulacak bölge burr ile dekortike edildi.

Daha sonra hazırlanan yatağa, greftler yerleştirildi. 1. ve 3. grup ratlara, başka bir işlem uygulanmadan lumbal bölgeye füzyon uygulandı ve vertebra üzerindeki kas tabakası 3,0 emilmeyen dikiş ipliği (Trofilen®; Doğsan, Trabzon, Türkiye) ile kapatıldı (Resim 7). Cilt 3.0 rapid vicryl ile kapatıldı. Ratlar kafeslerine kondu.



**Resim 7.** Füzyon sonrası kas tabakası kapatıldı.

2. ve 4. grup ratlara uygulanan greftlerin üzerine lokal olarak 0.3 ml amniyon sıvısı ilave edildikten sonra, füzyon uygulandı. Kas tabakası 3,0 emilmeyen dikiş ipliği (Trofilen®; Doğan, Trabzon, Türkiye) ile kapatıldı. Cilt 3.0 rapid vicryl ile dikildi. Ratlar kafeslerine konuldu.

Amniyon sıvısını; Karadeniz Teknik Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniğine başvuran, 20 haftalık normal gebeden, onam formu kullanarak, amniyosentez ile alındı. Alınan amniyon sıvısı, Heraeus Sepatech Megafuge 1.0R (Almanya) santrifüj cihazında 4300 devir hızda 15 dakika santrifüj edildi. Yaklaşık 0.1cc kadarı tüpün dibine çöktürüldü. Geri kalan yaklaşık 7.5cc süpernatant kısım alındı. -20°C’de buzdolabında saklandı. Cerrahi sırasında kullanılacak amniyon sıvısı, oda sıcaklığında yaklaşık 15 dakika bekletilerek çözünmesi sağlandı.

Ratlara cerrahi işlemden önce veya sonra enfeksiyon profilaksisi yapılmadı.

Ratlar, 3. ve 6. haftada yüksek doz anestezi madde verilerek öldürüldü. Ratlara, servikal dislokasyon yapılmadı. Çünkü, servikal dislokasyon yaparak, uygulanacak distraksiyonun füzyonu etkileyebileceği düşünülürdü. Ratlar, ameliyat masasına, alt ve üst ekstremitelerinden tutturuldu. Posterior orta hat insizyonu ile cilt, cilt altı ve kas tabaka geçilerek, füzyon hattına ulaşıldı (Resim 8). Füzyon bölgesi, proksimalinden ve distalinden füzyon sahasına zarar vermemeye çalışılarak, kemik makası kullanılarak kesildi. Füzyon bölgeleri, içinde % 10 formol bulunan şişelere yerleştirildi (Resim 9).



**Resim 8.** Ratlar öldürüldükten sonra, füzyon alanına ulaşıldı.





**Resim 9.**Ortalama boyuları 2x5cm boyutlarındaki füzyon sahası çıkarıldı.

Çıkarılan füzyon alanlarının her birine bir numara verildi. 30×24cm'lik röntgen kasedinin üzerine numara sırasına göre konularak, dijital olarak radyolojik görüntüleri çekildi. Örnekler, şişelerine formol sıvısı değiştirilerek geri kondu. %10'luk formaldehit içinde 24 saat bekletildi. 24 saat sonra formol solüsyonu tekrar değiştirildi. 20 gün oda sıcaklığında %10'luk formik asit içinde dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyon solüsyonu, bu süre içinde 3 günde bir değiştirildi. Örnekler, etanol serileriyle dehidrate edildi, ksilen ile temizlendi ve parafine gömüldü. Mikrotom bıçağı kullanılarak, 5µm kalınlığında longitudinal kesitler yapılarak hemotoksilen-eozin (H.E) ile boyandı. Tüm kesitler Karadeniz Teknik Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı tarafından ışık mikroskobu (Olympus BX-51) ile değerlendirilerek, mikro fotoğraflar çekildi.

Radyolojik bulgular Lenke'nin radyolojik değerlendirme sistemine göre değerlendirildi (Tablo 3) (29). Histopatolojik değerlendirmelerde ise Emery ve arkadaşlarının kullandığı skala sisteminden yararlanıldı (Tablo 4) (30).

**Tablo 3.** Lenke sınıflandırmasına göre radyolojik değerlendirme

4 puan	Bilateral büyük solid füzyon alanları
3 puan	Unilateral büyük- kontrlateral küçük solid füzyon alanları
2 puan	Bilateral küçük solid olmayan füzyon alanları
1 puan	Bilateral greft resorpsiyonu veya bilateral psödoartrosis

**Tablo 4.** Emery sınıflandırmasına göre histolojik değerlendirme

PUAN	DOKU ÖZELLİĞİ
7 puan	Sadece kemik doku
6 puan	Kemik doku, fibrokartilaj dokudan fazla
5 puan	Fibrokartilaj doku, kemik dokudan fazla
4 puan	Sadece fibrokartilaj doku
3 puan	Fibrokartilaj doku, fibröz dokudan fazla
2 puan	Fibröz doku, fibrokartilaj dokudan fazla
1 puan	Sadece fibröz doku
0 puan	Boş adacıklar

### İstatistiksel Değerlendirme

Grupların ikili karşılaştırılmalarında, Mann-Whitney U testi kullanıldı. SPSS 13.0 programı kullanıldı. Anlamlılık düzeyi  $p < 0.05$  olarak alındı.

## BULGULAR

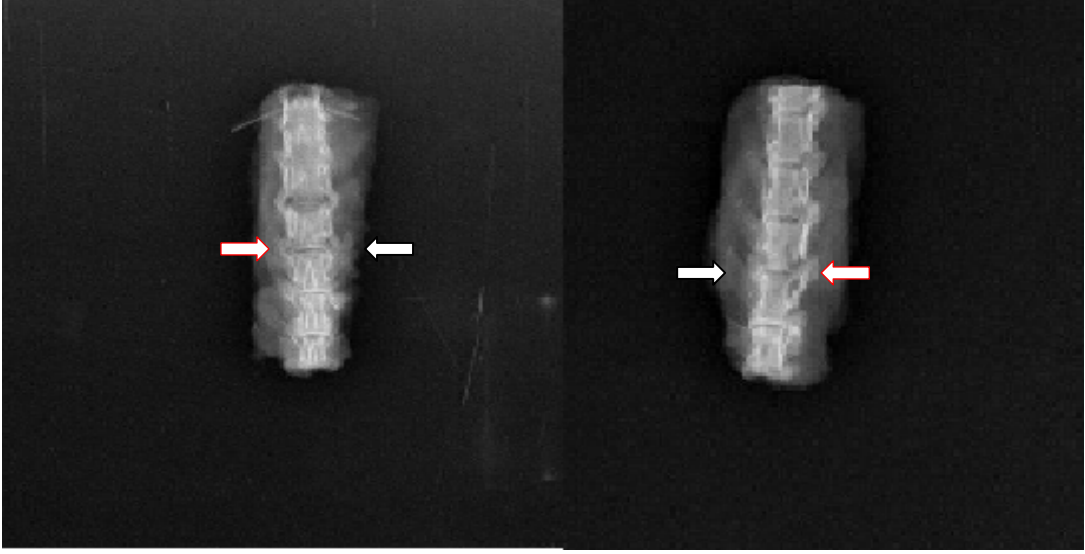
Çalışmamızda, ratlarda insizyon bölgesinde kızarıklık yoktu. Cerrahi uygulanan bölgede akıntı yoktu. Amniyon grubunda, amniyon sıvısının lokal uygulanması sonrasında herhangi bir immünolojik reaksiyonla karşılaşılmadı. Çalışmada, ratlarda ölüm olmadı. Çalışma dışında bırakılan rat olmadı.

### Radyolojik değerlendirme

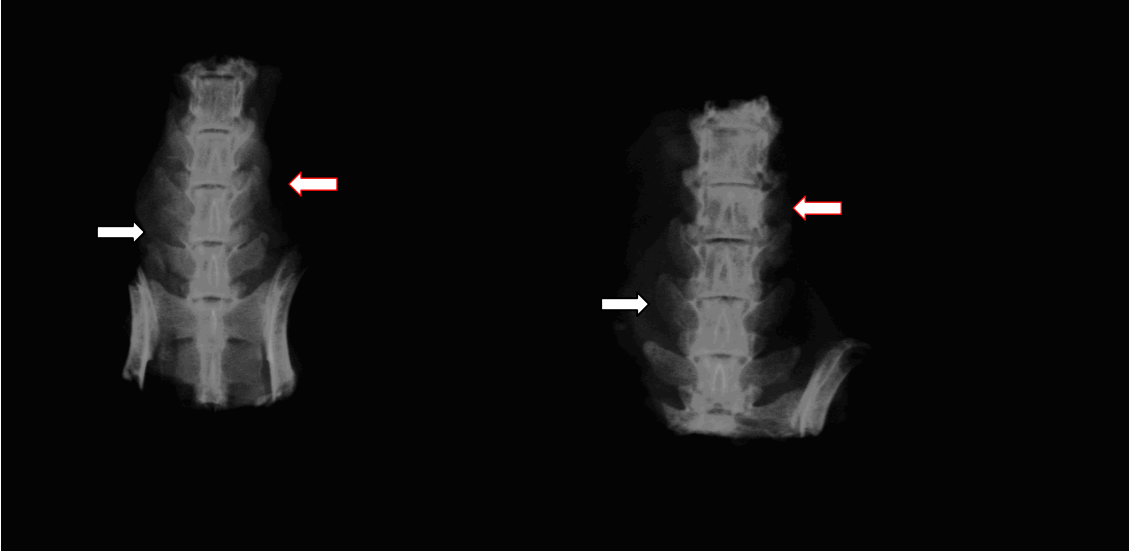
Tüm gruplarda oluşan füzyonun, 3. ve 6. hafta sonunda radyolojik görüntüleri alındı (Resim 10-11-12-13).



**Resim 10.** 3. hafta sonunda kontrol grubundaki 2 ratın lumbal bölgesindeki füzyonun radyolojik görüntülerinde, lumbal bölgedeki vertebraların her iki yanında kırmızı oklar küçük, solid olmayan füzyon alanları göstermektedir.

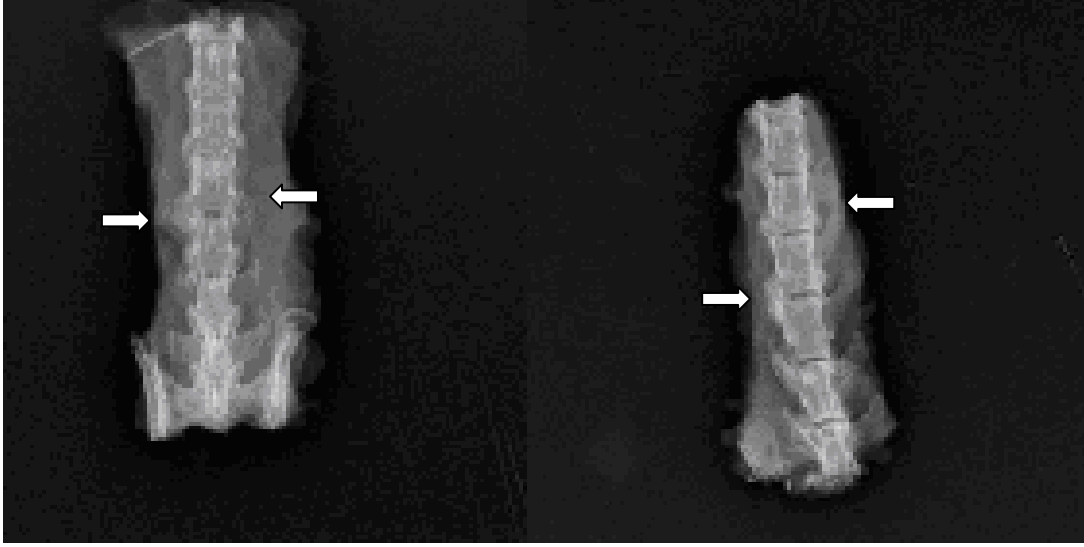


**Resim 11.** 3. hafta sonunda amniyon sıvısı uygulanan gruptaki 2 ratın lumbal bölgesindeki füzyonun radyolojik görüntülerinde, beyaz ok tek tarafta oluşan büyük, kırmızı ok ise diğer taraftaki küçük solid füzyon alanlarını göstermektedir.



**Resim 12.** 6. hafta sonunda kontrol grubundaki 2 ratın lumbal vertebralarındaki füzyonun radyolojik görüntüsünde, beyaz ok büyük solid füzyonu, kırmızı ok ise küçük solid füzyon alanlarını göstermektedir.





**Resim 13.** 6. hafta sonunda, amniyon sıvısı uygulanan gruptaki 2 ratın lumbal vertebralarındaki füzyonun radyolojik görüntüsünde, her iki tarafta beyaz oklar büyük füzyon alanlarını göstermektedir.

Kontrol ve amniyon grubundaki her ratın radyolojik görüntüleri, Lenke sınıflandırması kullanılarak değerlendirildi. Sonuçların ortalama rakamsal değerleri, Tablo 5’de verildi.

**Tablo 5.** 3. ve 6. hafta grupların radyolojik değerlendirme sonuçları

<b>RADYOLOJİK GÖRÜNÜM</b>			
	<b>3.HAFTA</b>	<b>6. HAFTA</b>	<b>P</b>
<b>KONTROL GRUBU</b>	2,43±0,535	2,57±0,535	0,606
<b>AMNİYON GRUBU</b>	2,86±0,690	3,14±0,378	0,335
<b>P</b>	0,225	0,044	

Kontrol grubunun radyolojik değerlendirmesinde, 6. hafta sonunda 3. haftaya göre daha iyi sonuç elde edilmesine rağmen, bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. (p=0,606)

Amniyon grubunun radyolojik değerlendirmesinde, 6. hafta sonunda 3. haftaya göre daha iyi sonuç elde edilmesine rağmen, bu fark istatistiksel olarak fark oluşturmadı. (p=0.335)

3. hafta sonunda, amniyon grubunun radyolojik değerlendirmesinde, kontrol grubuna göre daha iyi sonuç elde edilmesine rağmen, bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. ( $p=0.225$ )

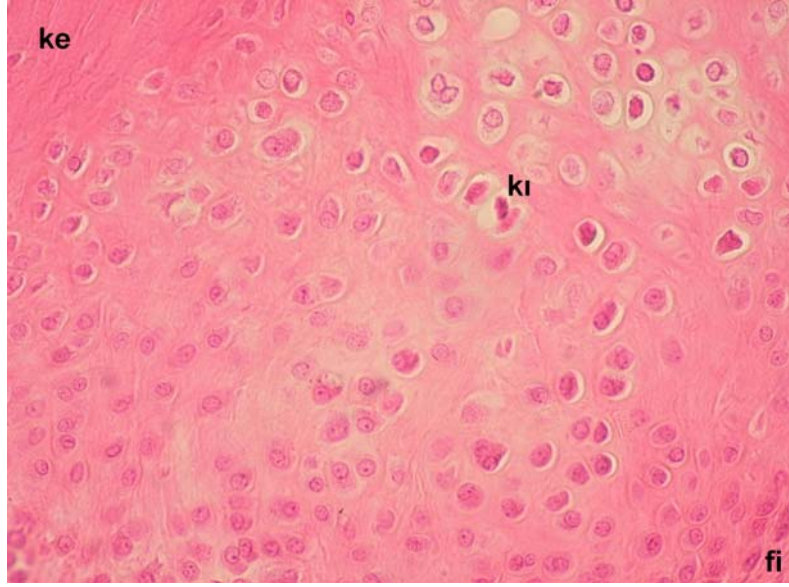
6. hafta sonunda, amniyon grubunun radyolojik değerlendirmesinde, kontrol grubuna göre daha iyi sonuç elde edildi. Bu sonuç, istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturdu. ( $p=0.044$ )

### **Histolojik Değerlendirme**

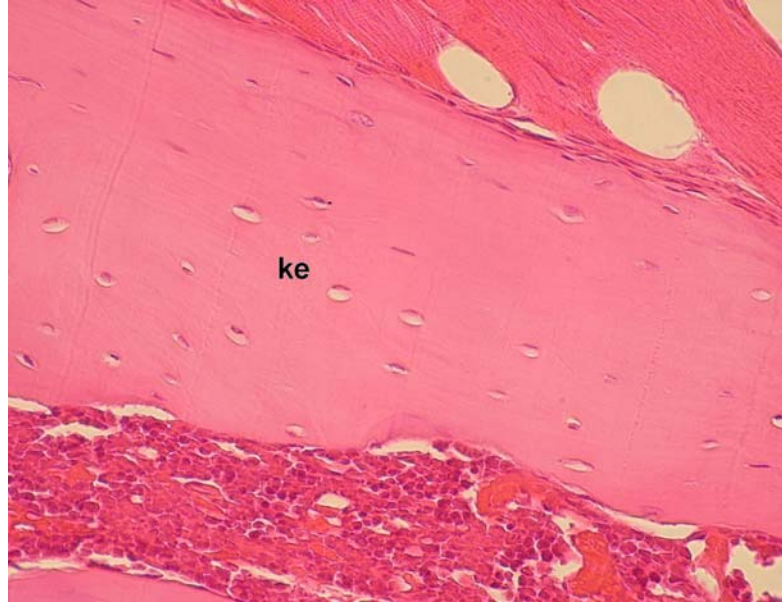
Histopatolojik incelemeler, ışık mikroskopisi ile değerlendirilerek, her gruba ait mikro fotoğraflar çekildi.(Resim 14-15-16-17)



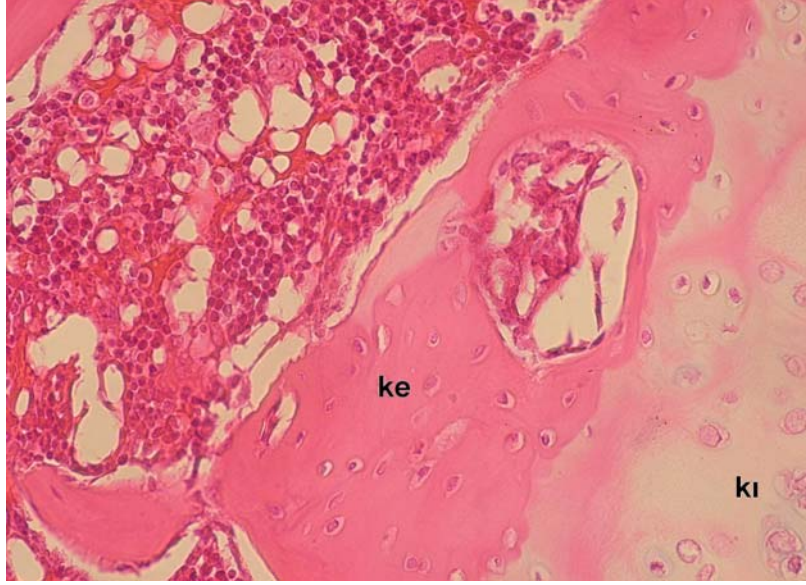
**Resim 14.** 3. hafta sonunda, amniyon grubundaki füzyonun 40x büyütmede, H.E. ile boyanmış histolojik kesitinde, kemik dokunun, fibrokartilaj doku ve fibröz dokudan daha fazla oranda olduğu görüldü:(ke=kemik, k1=fibrokartilaj, fi=fibrz doku)



**Resim 15.** 3. hafta sonunda, kontrol grubundaki füzyonun 40x büyütmede, H.E. ile boyanmış histolojik kesitinde, fibrokartilaj doku, kemik doku ve fibröz dokudan daha fazla oranda görüldü: (ke=kemik, k1=fibrokartilaj, fi=fibröz doku)



**Resim 16.** 6. hafta sonunda, amniyon grubundaki füzyonun, 40x büyütmede H.E. ile boyanmış histolojik kesitinde, kemik dokunun daha fazla oranda olduğu görüldü. Fibröz doku görülmedi: (ke=kemik doku)



**Resim 17.** 6. hafta sonunda, kontrol grubundaki füzyonun 40x büyütmede H.E. ile boyanmış histolojik görüntüsünde; kemik dokunun, fibrokartilaj dokudan daha fazla oranda olduğu görüldü: (ke: kemik doku, ki: fibrokartilaj doku)

Kemik doku, fibrökartilaj doku ve fibröz doku oranlarına bakılarak Emery sınıflandırmasına göre değerlendirmeler yapıldı. Sonuçların istatistiksel dağılımı Tablo-6'da verildi.

**Tablo 6.** 3. ve 6. hafta grupların histolojik sonuçlarının dağılımı

<b>HİSTOLOJİK GÖRÜNÜM</b>			
	<b>3.HAFTA</b>	<b>6. HAFTA</b>	<b>P</b>
<b>KONTROL GRUBU</b>	3,86±0,690	5,29±0,488	0,003
<b>AMNİYON GRUBU</b>	4,86±0,378	6,57±0,535	0,001
<b>P</b>	0,010	0,004	

Kontrol grubunun histolojik değerlendirmesinde, 6. haftada oluşan füzyonun, 3. haftadaki füzyondan daha iyi olduğu bulundu. Bu fark, istatistiksel olarak anlamlı idi (p=0.003).

Amniyon grubunun histolojik değerlendirmesinde; 6. haftada oluşan füzyonun, 3. haftadaki füzyondan daha iyi olduğu bulundu. Bu fark, istatistiksel olarak anlamlı idi (p=0.001).

Amniyon sıvısı ve kontrol gruplarının değerlendirmesinde; amniyon sıvısı grubundaki füzyonun, 3. ve 6. haftada kontrol grubundaki füzyondan daha iyi olduğu bulundu. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı idi (3. hafta için  $p=0.010$ , 6. hafta için  $p=0.004$ ).

Radyolojik ve histolojik değerlendirmelerimiz sonucunda, 6. hafta sonunda amniyon sıvısı grubundaki füzyon, kontrol grubuna göre histolojik ve radyolojik olarak istatistiksel olarak fark oluşturacak şekilde iyi bulundu. 3. hafta sonunda ise, amniyon grubunda oluşan füzyon kontrol grubuna göre radyolojik olarak istatistiksel fark oluşturamasa da, histolojik olarak fark oluşturdu.

## TARTIŞMA

Dekompresyon, redüksiyon, fokal eksizyon ve korreksiyon gibi vertebra cerrahilerinde ortak payda füzyondur (31). Son yıllarda vertebra cerrahisinde sağlanan gelişmelerle, füzyon gerektiren ameliyatlara sayısı giderek artmıştır (9). Ülkemizde tam bir rakam olmamakla beraber, senede 60-70 bin civarında ameliyat yapıldığı tahmin edilmektedir (9). Füzyon, vertebra cerrahileri ile düzeltilen vertebral instabilitelerin ve deformitelerinin ilerlemesinin önlenmesi ve vertebral kolonun stabilizasyonunun devamı için gereklidir (13). Füzyon, değişik tekniklerle yapılmaktadır (posterior, posterolateral, anterior, vb.). Bu cerrahi yöntemler; tarihçe, teknik ve uygulama açısından farklılıklar göstermektedir (9).

Füzyonda en sık karşılaşılan komplikasyon, psödoartroz olup (2), en sık lumbal vertebralarda görülmektedir (15). Spinal kolonun bölgeleri açısından bakıldığında ise; tensil kuvvetlere daha fazla maruz kalması nedeniyle arka kolonda, daha sık görülür (9). Literatürde; uzun kemik psödoartrozlarının histolojik yapısı ile ilgili birçok çalışma bulunmasına rağmen; bu durum spinal füzyon psödoartrozlarında böyle değildir (31). Psödoartroz tedavisinin başarısızlık oranı, % 35-51 arasında değişmektedir (9).

Çalışmamızda; daha stabil bir füzyon elde etmek için vertebral füzyonda rol oynadığı düşünülen büyüme faktörlerini ihtiva eden amniyon sıvısını kullandık. 6.hafta sonunda amniyon grubunda, kontrol grubuna göre radyolojik ve histolojik değerlendirmelerimizde daha iyi bir füzyon elde ettik. Amniyon sıvısının füzyonu olumlu etkilediğini bulduk. Amniyon sıvısı ile ilgili yapılan diğer çalışmalarda; amniyon sıvısının hücre farklılaşmasında, migrasyonunda ve değişik hücre tiplerinin invazyonunda olumlu etkilerinin olduğu belirtilmiştir(8). Özgenel ve arkadaşları, amniyon sıvısının perikondral greftlerde yeni kıkırdak oluşumunu hızlandırdığını ve bunun da amniyon sıvısı içeriğindeki zengin HA ve büyüme faktörlerinden kaynaklanabileceğini öne sürdüler (8). Özgenel ve arkadaşları; perikondriyal fleplerde kıkırdak dokusunun oluşmasında amniyon sıvısının etkisini inceledikleri başka bir

çalışmada; 8. hafta sonunda, skar dokusu ve yeni kırık oluşturmada, amniyon sıvısının içeriğindeki büyüme faktörleri ve ekstrasellüler matriks prekürsörlerinden dolayı olumlu etkisinin olduğunu bildirdiler (32).

Amniyon sıvısının, osteoblastik kemik oluşumunu artırıcı etkisi ile ilgili yapılan çalışmalarda; Karaçal ve arkadaşları, tavşanlardaki kemik defektlerine uyguladıkları amniyon sıvısı ile, 6. haftanın sonunda histopatolojik olarak kemikleşmenin daha iyi olduğunu bildirdiler (13). Kerimoğlu ve arkadaşları da; tibia kırıklarının iyileşmesi ile ilgili yaptıkları deneysel çalışmalarında; gebeliğin 2. trimesterinde alınan amniyon sıvısının, son trimesterden alınan amniyon sıvısına ve kontrol grubuna göre kırık iyileşmesini daha olumlu etkilediğini buldular (33). Aslan ve arkadaşları; tavşan tibialarındaki kemik defektleri üzerine yaptıkları çalışmalarında, HA'in greftle beraber uygulandığı grupta, sonuçların histolojik açıdan daha iyi olduğunu buldular. HA'in, kemik defektleri üzerinde olumlu etkisi olduğunu rapor ettiler (34).

Amniyon sıvısı içeriğindeki hiyaluronik asidin 16-20. gestasyonel periyottaki ortalama konsantrasyonu 20µg/ml'dir (20). Bu konsantrasyon, 30. haftada ortalama 1µg/ml'ye düşer ve son haftaya kadar sabit olarak kalır (20). Benzer şekilde; amniyon sıvısındaki diğer büyüme faktörlerinin konsantrasyonlarının da gestasyonel yaşla değiştiği bilinmektedir (11,27). Hofmann ve Abromowitz, amniyon sıvısı içeriğindeki EGF konsantrasyonunun 15-22. haftalar arasında 35±8 pM iken, 35-39. haftalar arasında ise 87±71 pM civarında olduğunu bildirdiler (35). Varner ve arkadaşları da, EGF seviyesinin gestasyonel haftaların sonlarına doğru yükseldiğini bildirdiler (36). Merimee ve arkadaşları, amniyon sıvısındaki IGF-1 ve 2'nin düzeylerini, 58 kadın üzerinde yaptıkları çalışmada IGF-1'nin seviyesini erken gestasyonel dönemde 20ng/ml, IGF-2 seviyesini 114±13 (+/-SE) ng/ml olarak ölçtüler, ancak gestasyonun 26. ve 33. haftalarında IGF'lerin düzeylerinde azalma olduğunu bildirdiler (26).

Çalışmamızda, özellikle 20. gestasyonel haftasında amniyon sıvısının yüksek düzeyde HA ve HASA içermesinden dolayı, 20. gestasyonel haftada alınan amniyon sıvısını posterior füzyonda kullandık. Özgenel'in, Karaçal'ın ve Kerimoğlu'nun yaptıkları çalışmalardaki amniyon sıvısı, 16-24 gestasyon haftaları arasındaki gebelerden alınmıştı. Bu nedenle biz de; literatür ile uyumlu olarak, bu periyotta alınan amniyon sıvısını kullandık. Gruplarımızdaki radyolojik ve histolojik değerlendirmelerimizi, 3. ve 6. haftalarda yaptık. Her gruba aynı gestasyon haftasındaki



amniyon sıvısını kullanarak, amniyon sıvısının füzyona etkisinin zamana karşı değişimini incelemeyi, bunu da literatürle kıyaslamayı amaçladık.

Çalışmamızda 3. hafta sonunda amniyon grubu ile kontrol grubu arasında Lenke radyolojik değerlendirme skalasına göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulmadık. 3. hafta sonunda amniyon grubumuzun radyolojik değerleri, Salamon ve arkadaşlarının ratlarda yaptıkları posterolateral füzyonda kullandıkları BMP-7'nin radyolojik değerleri ile karşılaştırdık (37). Çalışmamızda; amniyon grubundaki füzyonun Lenke sınıflamasına göre değerlerini, Salamon'un çalışmasındaki 3µg BMP-7 verilen gruptan daha yüksek bulduk. Ancak; değerlerimiz 10µg BMP-7 verilen gruptan daha düşük çıktı. BMP-7'nin yüksek dozu, 3 haftalık süre içinde amniyon sıvısından daha etkili oldu. Biz, çalışmamızda amniyon sıvısını değişik dozlarda kullanmadığımız için amniyon sıvısının dozu ile BMP-7 arasında karşılaştırma yapamadık.

3. hafta sonunda amniyon grubumuzun radyolojik değerlerini, Moazzaz ve arkadaşlarının çalışması ile de karşılaştırdık (29). Çalışmamızın, 3. hafta sonundaki değerlerini, overleri korunan 10µg BMP-7 uygulanan gruptan daha iyi olduğunu bulduk. Ancak, 30µg BMP-7 uygulanan ratlardaki füzyonun radyolojik değerleri, bizim 3. haftadaki değerlerimizden daha iyiydi. Salamon'un çalışmasında verilen 10 µg BMP-7'nin 3. hafta sonuçlarından daha düşük sonuçlarımız olmasına rağmen, bu çalışmada aynı miktarda verilen BMP-7'den sonuçlarımız daha yüksek çıktı. Bu çalışmalarla kıyaslandığında, amniyon sıvısının BMP'nin düşük dozlarından 3. hafta sonunda Lenke skalasına göre daha iyi sonuçlar elde ettik.

Çalışmamızda, kontrol ve amniyon gruplarında takip süremiz 6 haftaydı. 6 hafta sonunda elde ettiğimiz füzyonun radyolojik değerlerini Steven ve arkadaşlarının çalışması ile kıyasladık (38). Steven ve arkadaşlarının çalışmasında; Nell-1 proteininin kullanıldığı gruptaki radyolojik değerlerin, çalışmamızdaki amniyon grubuna göre daha iyi olduğunu tespit ettik. Ancak, bu çalışmadaki Nell-1 proteininin amniyon sıvısına göre hem uygulama tekniğinin, hem de elde edilmesinin daha zor olduğunu düşündük.

Bizim çalışmamızda, amniyon sıvısı posterior füzyonu 6. hafta sonunda olumlu etkiledi. Literatürde, füzyon ile yapılan diğer çalışmalarda Juang ve arkadaşları, füzyonda simvastatini kullandılar. Füzyonu, 9. hafta sonunda değerlendirdiler. Simvastatinin oral kullanımı ile yapılan bu çalışmada, simvastatinin füzyonu olumlu etkilemediğini rapor ettiler (39). Dimar ve arkadaşları, füzyonda nonsteroid



antiinflamatuvar ilaçların etkilerini araştırdılar. 12 hafta sonunda füzyonu değerlendirdiler. Sonuçta, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçların füzyonu olumsuz etkilediğini buldular (40). Huang ve arkadaşları; füzyonda alendronatın etkilerini incelediler. 8. hafta sonunda füzyonu değerlendirdiler. Sonuçta, alendronatın füzyonu olumsuz şekilde etkilediğini bildirdiler (41).

6. hafta sonunda yaptığımız histolojik incelemelerde, amniyon grubunda kemik dokuyu gördük. Fibrokartilaj dokuya oldukça az oranda rastlamamıza rağmen, fibröz dokuya rastlamadık. Literatürdeki biyofiziksel yöntemlerle ilgili yapılan çalışmalarda; Guizzardi ve arkadaşları ratlarda posterior füzyonda elektromanyetik alanın etkisini araştırdılar. Histolojik incelemelerde, 8. hafta sonunda kemik yapının görüldüğünü bildirdiler (42). Guizzardi'nin çalışma süresi, bizim çalışmamızdan uzundu. Pişkin ve arkadaşları da; tavşanlarda füzyonda, pediküllü kemik grefti iyileşmesine ultrasonun etkisini incelediler (31). 6. hafta sonunda füzyon alanlarını radyolojik ve histolojik olarak değerlendirdiler. Bu çalışmayla, takip sürelerimiz aynıydı. 6. hafta sonunda radyolojik olarak bizden daha iyi sonuçlar elde ettiler. Ancak hem Pişkin ve arkadaşlarının, hem de Guizzardi ve arkadaşlarının uyguladıkları yöntemin, bizim yöntemimize göre, hem maliyet, hem de uygulama yönünden daha zor olduğu düşünöldü.

Otogreftleme, füzyonun stabilitesinde önemli rol oynar (43). Biz de bu düşünceyle, literatürle uyumlu olarak çalışmamızda, lumbal bölgedeki vertebraların spinöz çıkıntılarını otogreft olarak kullandık. Bütün ratlarda aynı tekniğin aynı kişi tarafından yapılması ile greftlemeyi standartize etmeye çalıştık. Karaismailoğlu ve arkadaşları, posterior spinal füzyon oluşturmada otogreft, koral ve ksenogreft etkinliklerini araştırdılar. Otogreft ile greftlemede %85.7 oranında füzyon elde ettiler (2).

Literatürde; vertebrada psödoartroz riskinin azaltılıp, daha stabil bir füzyon elde edilmesi için amniyon sıvısı ile yapılan çalışma bulunmamasına rağmen, son yıllarda amniyon sıvısı ile ilgili hücresel düzeyde yapılan çalışmalarda, insan amniyon sıvısından pluripotent hücreler izole edilmiştir (44). Bu hücreler, amniyotik sıvı kaynaklı stem hücreler olarak adlandırılır ve adipojenik, osteojenik, endotelial, nörojenik, hepatik ve kondrojenik hücrelere dönüşümü arttırırlar (45). Biz; çalışmamızda, amniyon sıvısını santrifüj etmek suretiyle hücreden yoksun olarak kullandık. Böylece; hem amniyon sıvısının antijenik özelliği ortadan kaldırıldı, hem de

sadece büyüme faktörleri ya da HA ve HASA'nın füzyon üzerine olan etkilerinin sonuçlarının araştırılması sağlandı. Füzyona büyüme faktörlerinin mi, yoksa HA'in mi daha fazla etkilediğini belirtmek için daha kapsamlı ve ayrıntılı çalışmalar yapmak gerekmektedir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar, literatürde füzyona katkı amacıyla kullanılan maddelerin maliyetinin zorluğu ve teminindeki güçlükler nedeniyle, amniyon sıvısının bu maddelere alternatif olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

## SONUÇLAR

1-Posterior spinal füzyonda amniyon sıvısının füzyonu arttırıcı etkisinin olduğu bulunmuştur.

2-Amniyon sıvısının, 3. haftada kontrol grubuna göre, füzyonda radyolojik olarak istatistiksel fark oluşturmadığı, füzyonun Lenke sınıflamasına göre 3. haftada değerlendirilmesinde çok anlamlı olmadığını düşündük.

3- 6. hafta sonunda amniyon grubunda füzyonu hem radyolojik, hem de histolojik olarak kontrol grubuna göre istatistiksel fark oluşturacak şekilde daha iyi bulduk.

4-Amniyon sıvısı uygulanması yönteminin, literatürde füzyon için kullanılan diğer maddelerle karşılaştırıldığında, maliyeti az, elde edilmesi ve uygulanması daha kolay olduğu kanaatine varıldı.

5-Çalışmamızda ratlarda yan etki ve komplikasyona rastlanmadı.

6-Amniyon sıvısı uygulamasıyla, stabil füzyon elde edilerek tedavi maliyetinin en aza indirilebileceğini düşündük.

7-İnsanlarda füzyonda kullanımı için daha çok ve ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünüyoruz.

## ÖZET

### POSTERİOR SPİNAL FÜZYONDA AMNİYON SIVISININ ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Çalışmamızda, posterior vertebral füzyonda amniyon sıvısının etkileri araştırıldı. Bu amaçla 28 adet Sprague Dawley tipi erkek rat kullanıldı. Ratlar, rasgele 2 gruba ayrıldı. Çalışma ve kontrol grupları da, kendi içinde 3. ve 6. haftada değerlendirilmek üzere, 2'şer gruba ayrıldı. Böylece 7'şer rattan oluşan 4 grup elde edildi.

14 ratın füzyon sahasına, lokal olarak 0.3 ml amniyon sıvısı füzyonu hızlandırmak için ilave edildi. Kontrol grubuna amniyon sıvısı konulmadı. Ratların lumbal bölgesindeki vertebralarının spinöz çıkıntıları otogreft olarak kullanıldı. Tüm ratların lumbal bölgelerine posterior füzyon uygulandı. Tüm ratlar kafeslerinde tek olacak şekilde ve uygun koşullarda bakımları sağlandı. İlk 2 grup 3. haftada, geri kalanlar ise 6. haftada yüksek doz anestezi verilerek öldürüldü.

3. ve 6. hafta sonunda; sonuçlar Lenke radyolojik değerlendirme skalasına göre ve Emery histolojik değerlendirme skalasına göre değerlendirildi. Gruplar arasında; radyolojik olarak sadece 6. haftada fark var iken, histolojik olarak hem 3. haftada, hem de 6. haftada istatistiksel olarak fark bulundu. Amniyon sıvısı uygulanan gruplardaki füzyon, kontrol gruplarına göre daha iyi bulundu.

## **SUMMARY**

### **THE EFFECT OF HUMAN AMNION FLUID ON POSTERIOR SPINAL FUSION**

We examined the effects of amnion fluid on posterior spinal fusion on rats. 28 Sprague Dawley male rats were used in this study. The lumbar region of these rats were used as fusion area. Spinous processes of lumbar vertebrae were used as autografts.

0.3 ml amnion fluid was used on the autografts of 14 rats for acceleration of fusion process. Seven rats both control and amniotic groups were killed at the end of third week by giving high dose anesthetics. The other rats at the sixth week were killed by giving high dose anesthetics.

The fusion areas were examined radiologically and histopathologically at the end of third and sixth week. We have found statistical difference radiologically at the end of the sixth week between groups. Histologically, we found statistical difference between groups at the third and sixth weeks. Although new and more studies needed for the amnion fluid, we have found that amnion fluid has improved posterior spinal fusion on rats.

## KAYNAKLAR

1. Sama, Andrew A, Khan, Safdar N:High-dose alendronate uncouples osteoclast and osteoblast function: A study in a rat spine pseudoarthrosis model.Clin Orthop,425:135-142, 2004.
2. Karaismailoğlu N, Tomak Y, Andaç A, Ergün E:Posterior füzyon oluşturmada otogreft, koral greft ve ksenogreft etkinliklerinin karşılaştırılması.Acta Orthop Trau Turc,36:147-154,2002.
3. James P, Lawrence MD, Frank Enis MD: Effect of daily parathyroid hormone (1-34) on lumbar fusion in a rat model. The Spine Journal, 4:385-390,2006.
4. Hannouche D, Petite H, Sedel L:Current trends in the enhancement of fracture healing. J Bone and Joint Surg Br,83:157,2001.
5. Einhorn TA: Enhancement of fracture healing. J Bone and Joint Surg Am,77:940,1995.
6. Hill DJ, Teararwerk GJM, Arany E, Kilkenny D, Gregory M, Langford KS, Miell J: Fibroblast growth factor-2(FGF-2) is present in maternal and cord serum, and in the mother is associated with a binding protein immunologically related to the FGF receptor-1. J Clin Endocrinol Metab,80:1822,1995.
7. Bostrom MPG, Saleh KJ, Einhorn TA:Osteoinductive growth factors in preclinical fracture and long bone defects models. Orthop Clin North Am,30:647,1999.
8. Özgenel GY,Gülaydan F, Ozcan M:Effets of human amniotic fluid on cartilage regeneration from free perichondral grafts in rabbits.Br J Plast Surg,57:423,2004.
9. Yazar T, Altun N: Dejeneratif omurga hastalıkları Türk Omurga Derneği Yayınları, No:2, 2007, s.707-736.
10. Robbins K.C:Temel Patoloji (çev. U Çevikbaş) Nobel yayınları, No:5,1992,s.51.

11. Merimee TJ, Grant M, Tyson JE: Insulin-like growth factors in amniotic fluid. *J Clin Endocrinol Metab*,55:752,1984.
12. Laurent, T. C, Fraser J. R:Hyaluronan.*FASEB J*,6:2397,1992.
13. Karaçal N, Koşucu P, Cobanoğlu U, Kutlu N: Effect of human amniotic fluid on bone healing. *J Surg Res*, 129:283,2005.
14. Sasaki T, Watanabe C: Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high-molecular hyaluronic acid.16:9,1995.
15. Ege R: *Vertebra Omurga*, 1992, s:257.
16. Canale Terry S.: *Campbell's operative orthopaedics* (çev. I. Aygün) Hayat tıp kitapçılık, Onuncu baskı, Cilt 2,İstanbul,2007, s.1777-1778.
17. Çakmak M:*Ortopedi (Nobel Tıp Kitabevleri)*,İstanbul, 1998, s.177.
18. Marden L J, Hollinger, J O, Chaudhari, A, Turek, T, Schaub, R G, Ron, E: Recombinant human bone morfogenetic protein-2 is şuperior to demineralized bone matrix in repairing craniotomy defects in rats. *J Biomed. Res*, 28:1127,1994.
19. Sadler T W:*Langman's Medikal Embrioloji* (çev. C Başaklar) Palme Yayınları, No:105, Ankara,1993,s.102.
20. Dahl L B, Hopwood J J, Ulla B G, Laurent, Lilja K, Tengblad A: The concentration of hyaluronate in amniotic fluid. *Biochemical Medicine*,30:280-283,1983.
21. Dahl L. B, Dahl I. M S, Borresen A:The molecular weight of sodium hyaluronate in amniotic fluid. *Biochem. Medic. And Metab. Biology*, 35:219-216,1986.
22. Karaaslan Y: *Klinik romatoloji. Hekimler Yayın Birliği*, Ankara, 1996, s. 13-16.
23. Longaker M T, Adzick N S, Hall J. L, Stair S. E, Crombleholme T M, Duncan B W, Bradley S M, Harrison M R, Stern R: Studies in fetal wound healing,VII. Fetal wound healing may be modulated by hyaluronic acid stimulating activity in amniotic fluid. *J Pediatr. Surg.*,25:430,1990.
24. Murray RK, Granner D K, Mayes PA, Rodwell VW:*Harper'ın Biyokimyası* (çev. G Menteş, B Ersöz) Barış Kitabevi, 22. baskı, Ankara, 1993, 6.böl: s.832.
25. Murray RK, Granger DK, Mayes PA, Rodwell VW: *Harper's Illustrated Biochemistry*. Twenty sixth ed, Lange Medical Publications/McGraw-Hill, 2003, pp. 542-555.

26. Verhaeghe J, Coopmans W, van Herck E: IGF-I, IGF-II, IGF binding protein 1, and c-peptide in second trimester amniotic fluid are dependent on gestational age but do not predict weight at birth. *Pediatr Res*,46:101,1999.
27. Michalsky M P, Lara-Marquez M, Chun L, Besner G E: Heparin-binding EGF-like growth factor is present in human amniotic fluid and breast milk. *J Pediatr Surg*, 37 (1): 1-6, 2002.
28. Bayramiçli M: Deneysel mikrobiyoloji(ARGOS iletişim hizmetleri reklamcılık ve ticaret A.Ş.), 1. Baskı,İstanbul,2005, s.122,128,155.
29. Moazzaz, Payam B A, Gupta, Munish C, Gilotra, Mudit M, Gilotra, Mohit N BS, Maitra, Sukanta BA, Theerajunyaporn, Thongchai MD, Chen, James L MPH, Reddi, Hari A, Martin, Bruce R: Estrogen-dependent actions of bone morphogenetic protein-7 on spine fusion in rats. *Spine*, Vol.30(15): 1706-1711, 2005.
30. Emergy S A, Brazinski M S, Koka A, Bensusan J S, Stevenson S: The biological and biomechanical effects of irradiation on anterior spinal bone grafts in a canine model.*The Journal of Bone and Joint Surg*,76-A:540-548,1994.
31. Pişkin A:Spinal füzyonda pediküllü kemik grefti iyileşmesine ultrasonun etkisi. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi. Trabzon 2004, s.34-36.
32. Özgenel GY: The influence of human amniotic fluid on the potential of rabbit ear perichondral flaps to form cartilage tissue. *Br J Plast Surg*, 55 (3): 246-250, 2002.
33. Kerimoğlu S MD, Livaoğlu M MD, Sönmez B MD, Yuluğ E MD: Effect of human amnion fluid on fracture healing on rat tibia. *Journal of Surg. Researc*, (Yayın aşamasındadır).
34. Aslan M, SimsekG, Dayi E:The effectof hyauronic acid-supplemented bone graft in bone healing:experimental sudy in rabbits. *J Biomater Appl*, Vol.20(3):209-20,2006.
35. Hofmann GE, Abromowicz JS: Epidermal growth factor (EGF) concentrations in amniotic fluid and maternal urine during pregnancy.*Acta Obstet Gynecol Scand*, 69: 217, 1990.
36. Varner MV, Dildy GA, Hunter C,et al.: Amniotic fluid epidermal growth factor levels in normal and abnormal pregnancies. *J Soc Gynecol Investig.*, 3:17, 1996.
37. Salamon, Michael L, Althausen, Peter L, Gupta, Munish C, Laubach, Justin: The effects of BMP-7 in a rat posterolateral intertransverse process fusion model. *J Spinal Disord Tech*, Vol.16: 90-95, 2003.



38. Steven S. Lu MD, Xinli Zhang MD, PhD, Chia Soo MD, Tiffany Hsu DDS, Antonia Napoli MS, Tara Aghaloo MD, DDS, Benjamin M. Wu DDS, PhD, Paul Tsou MD, Kang Ting DMD, DMedSci, Jeffrey C. Wang MD: The osteoinductive properties of NELL-1 in a rat spinal fusion model. *The Spine Journal*, Vol.7(1):50-60,2007.
39. Albert Juang Ming Yee MD, Hyun W, Bae MD, Darin Friess MD, Sandie M. Roth MSc, Cari Whyne PhD, Mark Robbin MD, Brian Johnstone PhD, Jung U. Yoo MD: The use of simvastatin in rabbit posterolateral lumbar intertransverse process spine fusion. *The Spine Journal*, Vol.6:391-396,2006.
40. Dimar, John R II MD, Ante, William A, BS: Zhang, Y Ping PhD, Glassmann, Steven D MD: The effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on posterior spinal fusions in the rat. *The Spine*, Vol. 21:1870-1876,1996.
41. Huang, Russel C MD, Khan, Safdar N MD, Sandhu, Harvinder S MD, Metz, Joshua A BS, Frank P Jr MD, Zheng, Fengyu MD, Sama, Andrew A MD, Lane, Joseph M MD: Alendronate inhibits spine fusion in a rat model. *The Spine*, Vol.30:2516-2522,2005.
42. Guizzardi S, Di Silvestre M, Govoni P, Scandroglio R: Pulsed electromagnetic field stimulation on posterior spinal fusions: a histological study in rats. *J Spinal Disord*, Vol.7(1):36-40,1994.
43. Cui Qunjun MD, Ming Xiao, Zeng MD, Balian, Gary PhD, Wang, Gwo-Jaw MD: Comparison of lumbar spine fusion using mixed and cloned marrow cells. *Spine*, Vol.26: 2305-2310,2001.
44. De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM: Isolation of amniotic cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol*, 25: 100, 2007.
45. Kolambkar YM, Peister A, Soker S: Chondrogenic differentiation of amniotic fluid-derived stem cells. *J Mol Hist*, 38: 405, 2007.