T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL VERTEBRAL FÜZYON ÜZERİNE KEMİK GREFTLERİ VE İNSAN AMNİYON SIVISININ ETKİLERİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Turan Cihan DÜLGEROĞLU

KAYSERİ–2011

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİMDALI

DENEYSEL VERTEBRAL FÜZYON ÜZERİNE KEMİK GREFTLERİ VE İNSAN AMNİYON SIVISININ ETKİLERİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Turan Cihan DÜLGEROĞLU

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Mithat ÖNER

KAYSERİ–2011

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini aktararak yetişmemde büyük emeği olan Anabilim Dalı Başkanımız Sayın **Prof. Dr. Mahmut ARGÜN** başta olmak üzere, tez çalışmasının fikir bazında oluşmasında, proje ve yapım aşamasında katkısını esirgemeyen **Prof. Dr. Şevki ERDEM** ve çalışmanın her basamağında desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın **Doç. Dr. Mithat ÖNER'e** teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca üzerimde emekleri olan değerli hocalarım; **Prof. Dr. Ali BAKTIR, Prof. Dr. C. Yıldırım TÜRK, Prof. Dr. Mahmut MUTLU, Prof. Dr. Sinan KARAOĞLU, Prof Dr. Mehmet HALICI, Doç. Dr. Fuat DUYGULU, Doç. Dr. Ahmet GÜNEY, Öğr. Gör. Dr. İbrahim KAFADAR**'a ve histolojik çalışmalarını yapan Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı. **Prof. Dr Saim ÖZDAMAR** ve **Öğr.Gör. Arzu YAY**, radyolojik çalışmaları yapan **Öğr. Gör. Dr. Serap DOĞAN,**biyokimyasal çalışmalardaki katkısından dolayı **Uzm.Dr RECEP SARAYMEN'**e, istatistiksel analizlerin yapımındaki katkılarından dolayı Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğr. Gör. **Ferhan ELMALI**'ya ve Biyoistatistik uzmanı **Ruşen EREZ**'e teşekkür ederim. Bu çalışmanın gerçekleşmesinde sağladığı katkıdan ötürü Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR i

İÇİNDEKİLER ii

KISALTMALAR v

RESİM LİSTESİ vi

TABLO ve ŞEKİL LİSTESİ viii

ÖZET ix

ABSTRACT x

1. GİRİŞ VE AMAÇ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1.TERMİNOLOJİ 4

2.2.FÜZYON ENDİKASYONLARI VE TEKNİKLERİ 5

2.2.1 Füzyon Endikasyonları 5

2.2.2 Füzyon Teknikleri 5

2.2.2.1. Posterior Füzyon 6

2.2.2.2 .Posterolateral veya İntertransvers Füzyon 6

2.2.2.3. Lateral Füzyon 7

2.2.2.4. Anterior Füzyon 7

2.2.2.5.Anterolateral füzyon 7

2.2.2.6. İnterbody Füzyon 7

2.2.2.7. Minimal İnvazif Anterior Füzyon 8

2.3.GREFT TÜRLERİ 8

2.3.1.Otolog Kemik Greftleri 8

2.3.2.Otolog Kansellöz Kemik 8

2.3.3.Damarlı Olmayan Otolog Kortikal Kemik 9

2.3.4.Damarlı (Vaskülarize) Otogreftler 10

2.3.5 Kemik iliği 11

2.3.6.Allogreftlerin Genel Özellikleri 11
2.3.7.Morselize ve Kansellöz Allogreftler 13
2.3.8. Demineralize Kemik Matriks 13
2.3.9.Osteokondral ve Kortikal Allogreftler 14
2.3.10.Seramik Matriksler 15
2.3.11.Hızlı Rezorbe Olan Seramikler ve Kalsiyum Tuzları 15
2.3.12.Yavaş Rezorbe Olan Seramikler 16
2.3.13.Enjekte Edilebilen Seramik Çimentolar 16
2.3.14.Kollajen 17
2.3.15.Kalsiyum – kollagen greft materyalleri 17
2.3.16.Biyoaktif Camlar 17
2.3.17.Cam iyonomerleri 18
2.3.18.Aluminyum Oksit 18
2.3.19.Kemik Morfojenik Proteinleri (BMP) 18
2.3.20. Diğer Büyüme Faktörleri 19
2.4.BÜYÜME FAKTÖRLERİ 19
2.5. AMNİYON SIVISI 20
2.6.RAT ANATOMİSİ 20
3. GEREÇ VE YÖNTEM 22
3.1. Hayvanlar ve çalışma grupları 22
3.2. Allogreft ve DKM elde edilmesi 23
3.3. Amniyon sıvısı elde edilmesi 24
3.4.Vertebral füzyon 25
3.5.Cerrahi müdahale sonrası takip 28
3.6. Hayvanların sakrifiye edilmesi 28
3.7.Radyolojik inceleme 29

3.8.Histolojik inceleme 29
3.9.İstatistiksel Değerlendirme 30
4.BULGULAR 31
4.1.Radyolojik Değerlendirme 31
4.2.Histolojik Değerlendirme 39
5.TARTIŞMA 45
6.SONUÇLAR 52
KAYNAKLAR 53

KISALTMALAR

BMP	: Bone matrix protein (Kemik matriks protein)
DKM	: Demineralize Kemik Matriks
EGF	:Epidermal büyüme faktörü
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
HA	: Hyaluronik asit
HASA	: Hyaluronik asit stimüle edici faktör
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
PDGF	: Trombosit aktive edici büyüme faktörü
TGF	: Transforme edici büyüme faktörü

RESİM LİSTESİ

Resim 1. Ratlardan elde edilen allogreft.....23

Resim 2. DKM in elde edilmesi.....24

Resim 3. İnsan amniyon sıvısının greftlere uygulanması.....25

Resim 4. Ratların ameliyat hazırlığı.....25

Resim 5. Ameliyat sahası hazırlığı.....26

Resim 6. Posterior spinal adelelerin sıyrılması.....27

Resim 7. Spinöz proçeslerin çıkarılması.....27

Resim 8: Allogreftlerin yerleştirilmesi.....28

Resim 9. Sekizinci haftada otogreft grubu ratın A-P röntgenogramı.....32

Resim 10. Sekizinci haftada otogreft+amniyon sıvısı grubunda ratın A-P röntgenogramı.....33

Resim 11. Sekizinci haftada Allogreft grubunda ratın lumbar A-P röntgenogramı.....33

Resim 12. Sekizinci haftada Alogreft+amniyon sıvısı grubunda ratın lumbar A-P röntgenogramı.....34

Resim 13. Sekizinci haftada Allogreft+amniyon sıvısı grubunda ratın lumbar yan röntgenogramı.....34

Resim 14. Sekizinci haftada DKM grubunda ratın A-P röntgenogramı.....35

Resim 15. Sekizinci haftada DKM +Amniyon sıvısı grubunda ratın lumbar A-P röntgenogramı.....35

Resim 16. Sekizinci haftada otogreft grubundaki ratın mikroskopik görüntüsü.....39

Resim 17. Sekizinci haftada, otogreft + amniyon sıvısı grubundaki ratın mikroskopik görüntüsü.....40

Resim 18. Sekizinci haftada Allogreft grubundaki ratın mikroskopik görüntüsü.....41

Resim 19. Sekizinci haftada Allogreft + amniyon sıvısı grubundaki ratın mikroskopik görüntüsü.....42

Resim 20. Sekizinci haftada Allogreft +amniyon sıvısı grubundaki ratın mikroskopik görüntüsü..... 42

Resim 21. Sekizinci haftada DKM grubundaki ratın mikroskopik görüntüsü 43

Resim 22. Sekizinci haftada DKM +amniyon sıvısı grubundaki ratın mikroskopik görüntüsü..... 44

TABLO ve ŞEKİL LİSTESİ

Tablo 1. Lenke sınıflandırmasına göre radyolojik değerlendirme skalası 29

Tablo 2. Emery sınıflandırmasına göre histolojik değerlendirme skalası 30

Tablo 3. Sekizinci haftanın sonunda grupların radyolojik ve histolojik skalalarına göre medyan değerlerlerinin grafikle analizi 36

Tablo 4 Sekizinci haftanın sonunda grupların radyolojik ve histolojik değerlendirmelerinin sonuçları 38

Şekil 1. Ratın iskelet yapısı 21

DENEYSEL VERTEBRAL FÜZYON ÜZERİNE KEMİK GREFTLERİ VE İNSAN AMNİYON SIVISININ ETKİLERİ

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı ratlarda vertebral füzyon oluşumuna kemik greftleri ve insan amniyon sıvısının füzyona etkisini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntemler: Bu çalışmada, ortalama ağırlıkları 250gr (200-300gr) olan, 24 haftalık, 72 adet Spraque Dawley cinsi rat kullanıldı. Ratlar altı ayrı gruba ayrıldı. **Grup I** Otogreft, **Grup II** Otogreft ve İnsan amniyon sıvısı, **Grup III** Allogreft, **Grup IV** Allogreft ve İnsan amniyon sıvısı, **Grup V** DKM, **Grup VI** DKM ve İnsan amniyon sıvısı olacak şekilde onikişer rat içeren altı grup oluşturuldu. **Grup II,IV,VI** 'da 0.5 cc amniyon sıvısı kullanıldı. L4-L6 vertebralara dekortikasyon oluşturulduktan sonra spinal füzyon uygulandı. Tüm hayvanlar sekizinci haftanın sonunda sakrifiye edildi. Gruplarda yapılan füzyonların sonuçlarının değerlendirilmesi, Lenke'nin radyolojik ve Emery'nin histolojik skorları kullanılarak yapıldı.

Bulgular: Sekizinci haftanın sonunda, histolojik ve radyolojik skorlara bakıldığında otogreft grubuna göre otogreft+amniyon sıvısı, allogreft, allogreft+amniyon sıvısı grubu ve DKM +amniyon sıvısı grupları arasında istatiksel olarak anlamlı fark bulundu. Allogreft+amniyon sıvısı grubunun histolojik verileri, allogreft grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0.0083$). DKM +amniyon sıvısı grubunun radyolojik verileri, DKM grubunun radyolojik verilerine göre istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0.0083$). Allogreft grubunun amniyon sıvısı ile kombinasyonunda histolojik ve radyolojik olarak füzyonun daha iyi olduğu gözlendi.

Sonuç: Sekizinci haftanın sonunda amnion sıvısı gruplarında füzyonun diğer gruplara göre daha iyi olduğu görüldü. Vertebral füzyonun daha iyi olmasını, amniyon sıvısı içerisindeki hyaluronik asit ve diğer büyüme faktörlerinin etkisine bağlı olabileceğini düşünüyoruz. Amniyon sıvısının bu etkinliği yeni klinik ve deneysel çalışmalarla desteklenerek vertebral spinal füzyonda ve diğer füzyon gerektiren işlemlerde, füzyonu artıran ajanlara göre amniyon sıvısını alternatif haline getirebilir.

Anahtar kelimeler: Amniyon sıvısı, Demineralize Kemik matriks(DKM), Kemik grefti, Spinal füzyon.

THE EFFECTS OF HUMAN AMNIOTIC FLUID AND BONE GREFT ON VERTEBRAL FUSION IN AN EXPERIMENTAL MODEL

ABSTRACT

Purpose: The aim of this study is to evaluate the effects of human amniotic fluid and bone grafts on rat vertebral fusion model.

Material & Method: In this study, 24 weeks old,72 Spraque Dewley Rats, with an average weight of 250 gr (200-300 gr), 24 weeks-old, were used. Rats were divided into 6 subgroups, named; **group I** autograft, **group II** autograft and human amniotic fluid, **group III** allograft, **group IV** allograft and human amniotic fluid, **group V** demineralizated bone matrix, **group VI** demineriliZated bone matrix and human amniotic fluid, including 12 rats in each group. 0.5 cc human amniotic fluid was used for each subject in **groups II, IV, VI.**

4^{th}-6^{th} lomber vertebra were fusioned after decortication. All subjects were sacrificed at the end of eight weeks. Lenke radiologic and Emery histological classification were used for the evaluation of fusion.

Results: At the end of eight weeks the radiological and histological scores of autograft with amniotic fluid (group II), allograft (group III), allograft with amniotic fluid (group IV) and demineralized bone matrix with amniotic fluid (group VI) were significantly better than the isolated autograft (group I) usage.Allograft with human amniotic fluid group's histological findings were significantly more favorable than the allograft group ($p<0.0083$). Radiological findings of the demineralized bone matrix with amniotic fluid (group 6) were significantly more favorable than the demineralized bone matrix group ($p<0.0083$). The combination of allograft with amniotic fluid had more sufficient fusion according to histological and radiological classification scoring.

Conclusion: At the end of the 8^{th} week, the fusion formation in amnion fluid groups had greater values than the other groups. The increase in the formation of fusion might be due to the hyaluronic acid depends on the hyaluronic acid and the other growth factors in the human amniotic fluid. Amniotic fluid usage in the cases which need fusion might be a good alternative in the future.

Keywords: Amniotic fluid, Bonegraft, Demineralized bone matrix, Spinal fusion.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Füzyon; tek bir bütün kemik elde etmek için, iki veya daha fazla kemiğin katıldığı cerrahi bir işlemdir. Füzyon oluşturulması vertebra cerrahisinin başarısı için oldukça önemlidir. Vertebra cerrahisindeki gelişmeler, füzyonun önemini daha da arttırmaktadır.

Vertebra cerrahisi; omurga instabilitelerinin tedavisinde, kırıklarda, artritik hastalıklarda, dejeneratif hastalıklarda, disk lezyonlarında, omurga infeksiyonlarında ve omurga deformitelerinin düzeltilmesinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (1). İliak kanattan alınan otogreft, spinal artrodezde geniş füzyon kitlesi oluşturmak için altın standart konumundadır. Hibbs ve Albee nin 1911 yılında tanımladığı posterior füzyon ameliyatında, solid füzyon sağlamadaki eksiklik, vertebra cerrahisinde büyük bir sorun olarak karşımızda durmaktadır. Tüm spinal füzyon cerrahilerinde internal tespit yapılmasına rağmen kaynamama oranı % 10-15 arasında değişen sıklıklarda görülür (2). Kaynamama görülen olgularda hastaların memnuniyetsizliğinden dolayı revizyon ameliyatları gerekmektedir.

Vertebralarda füzyonu meydana getirmek için, biyolojik ve mekanik faktörlere ihtiyaç duyulmaktadır (3). Biyolojik faktörler; eklem kıkırdağının çıkarılması, dekortikasyon, greftleme ve füzyon uygulanan bölgenin hareketsiz bırakılmasıdır. Mekanik faktörler ise; vertebrayı tespitte kullanılan rot, plak, tel, kanca, alçı, korse ve cihaz gibi tespit araçlarıdır.

Füzyonun sağlam internal tespit ile mekanik olarak güçlendirilmesi, kaynamama oluşmasını tamamen ortadan kaldırmaz. Bu yüzden biyolojik faktörler giderek önem kazanmaktadır. Bunun yanında, biyolojik faktörlerden; özellikle kemik greftlerinin

klinik düzeyde alternatiflerinin araştırılması için çalışmalar yapılmaktadır (3). Primer spinal füzyon ameliyatında ortaya çıkan dezavantajlar; yüksek kaynamama oranı ve otogreft kullanılmasına bağlı olarak donör saha morbiditesidir (4). Greftlere olan ihtiyacı azaltmak için, kemik üzerine anabolik etkisinin olduğunu bildiğimiz mediatörler kullanılabilir (5). 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 (6,7). 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 (7-9). TGF-β1, kemik defektlerinin iyileşmesini olumlu yönde etkiler (9). IGF I-II, kemik iyileşmesindeki matriksi sentezleyen büyüme faktörleridir (10). 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 (11-13). 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 (11,13). HA, özellikle yumuşak konnektif dokuda bulunan, ekstraselüler yüksek moleküler ağırlıklı polisakkarittir. HA, hücre farklılaşmasında, hücre hareketinde, hücrelerin yapışmasında rol oynayan, antiinflamatuar özellikleri olan bir polisakkarittir (14). Osteoblastik kemik oluşumunu arttırıcı etkisi de vardır (11). Hiyaluronik asidin; mezenkimal hücre farklılaşmasını arttırarak, yeni kemik oluşumunu arttırma kapasitesine sahip olduğu da literatürde bildirilmiştir (15,16).

Amniyon sıvısının pek çok biyolojik özelliği olup literatürde vertebral füzyonda kullanımı ile ilgili çok az çalışma bulunmaktadır. Bundan dolayı bu çalışmada deneysel vertebral füzyon modeli oluşturarak kemik greftleri ve amniyon sıvısının füzyon üzerine etkisini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

Omurgada en küçük hareketli segment (motor segment); iki omur, omurlar arasındaki disk, çeşitli ligamanlar ve faset eklemlerinden oluşur. Hareketli segmentin stabilitesi ligamanlar, faset eklemleri ve omurlar arasındaki disk tarafından sağlanır. Spinal stabilizasyon uygulamaları son yıllarda giderek artış göstermesine rağmen yapılan enstrümantasyon ve füzyon ameliyatlarının endikasyonlarıyla ilgili değişik görüşler mevcuttur (17).

İlk spinal füzyon 1911 yılında Albee ve Hibbs adlı iki farklı cerrah tarafından yapılmıştır. Albee otolog tibia grefti kullanarak, spinöz çıkıntıları ayırarak, tibial grefti spinöz çıkıntıların arasına yerleştirmiştir. Hibbs ise spinöz çıkıntı tabakalarını lamina üzerine yerleştirmiştir (18). 1920'lerde Campell trisakral füzyon ve iliak krestten greft alma tekniğini tanımlamıştır.

Amerikada yaklaşık olarak her yıl 200.000 spinal füzyon operasyonu gerçekleştirilmektedir (19). Spinal artrodez uygulamasında iki primer sorun; iliak kemik alınan bölgenin morbiditesi ve kaynamama görülmesidir (20).

Kemik enfeksiyonları, travma, konjenital anomaliler, kas iskelet sistemi tümör cerrahisi, revizyon artroplasti cerrahisi ve spinal cerrahi gibi rekonstrüktif işlemler sırasında oluşan kemik defektlerini tedavi etmek amacıyla kemik greftleri ve kemik yerini tutabilecek maddeler artan sıklıkla kullanılmaktadır. Kemik grefti olarak otogreftler ve allogreftler kullanılır. Kemik yerine geçebilecek maddeler arasında ise seramikler (doğal ve sentetik), DKMi, BMP (kemik morfojenik protein), otolog kemik iliği, büyüme faktörleri ve kompozit greftler tercih edilebilir (21,22).

Kemik doku mühendisliğinin temeli, kemiğin istenen anatomik bölgesinde kemik iyileşmesi için yanıt oluşturmaktır. Klinik başarı, oluşan kemiğin yeniden şekillenme sonucu çevre kemik dokusu ile yapısal olarak bütünleşmesi (integration) ve oluşan kemiğin fonksiyon görmek için yeterli mekanik dayanıklılığa sahip olması ile belirlenir. Spinal füzyon; başlangıç (inflamatuar) fazı, orta (tamir) faz ve son olarak da geç (yeniden şekillenme) faz olmak üzere 3 fazdan oluşmaktadır. Başlangıç aşamasında ya da başka ifadeyle inflamatuar aşamada; dekortikasyondan dolayı oluşan hematom, inflamatuar hücrelerin akımına uğrar ve fibrovasküler bir stroma oluşur. Kemik morfojenik proteinleri 4 ve 6 (BMP-4, BMP-6), alkalin fosfataz ve osteonektin seviyeleri yükselir. Başlangıç fazı, 1-3 hafta sürmektedir. Dördüncü ve beşinci haftaya denk gelen orta faz veya tamir fazı; artmış yeniden damarlanmadan, nekrotik kemiğin rezorbsiyonundan, osteoblastik ve kondroblastik hücrelerin farklılaşmasından oluşur (23,24). Komşu transvers çıkıntılarda oluşan iki alanı birleştirmek üzere, ortada enkondral 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 enkondral yapıdadır (10). Kemik greftlerinin biyolojisini anlamak için bazı kavramların açıklanması gereklidir. Bunlar terminoloji alt başlığında incelenecektir (23,24):

2.1.TERMİNOLOJİ

Osteointegrasyon: Greftin arada fibröz doku oluşumuna yol açmayacak şekilde alıcı kemik yüzeyine kimyasal olarak tutunabilmesidir.

Osteokondüksiyon: Alıcı kemikten vasküler ve perivasküler yapıların grefte ilerlemesi için greftin çatı görevi üstlenerek yüzeyinde yeni kemik oluşumunu destekleyebilmesidir.

Osteoindüksiyon: Plüripotent hücrelerin çevre dokuda osteoblastik fenotipe dönmelerini uyarabilmektir.

Osteogenezis: Greft materyali içindeki hücresel elemanlanların, transplantasyon sonrası hayatta kalarak, nakledilen alanda yeni kemik oluşturabilmesidir.

Yeni kemik dokusu ortaya çıkabilmesi için öncelikle kemiği meydana getirebilecek yeterli sayıda "osteojenik progenitor hücreler" ortamda bulunmalıdır. Kullanılan greft materyalleri osteointegrasyon, osteogenezis, osteokondüktif veya osteoindüktif özelliklerin birine veya birden fazlasına sahiptirler.

Bu özelliklerin bazıları sentetik materyallerde ve saflaştırılmış büyüme faktörlerinde de bulunmaktadır. Bu da doku mühendisliğini, mevcut maddelerin kombinasyonları veya yeni materyaller ile kırık iyileşmesi için en uygun ortamın ve greftleme metotlarının geliştirilmesi yoluna itmiştir. Bu sayede greftleme tekniklerinin maliyetinin azaltılması ve tedavide yeniliklerin elde edilmesi amaçlanmaktadır (25).

Bir bölgeden alınan greftin, greft alınan aynı canlının başka bir bölgesine taşınması söz konusuysa grefte **otogreft** denir. Tek yumurta ikizleri arasında yapılan doku transferlerinde, transfer edilen doku ise **izogreft** olarak adlandırılır. **Allogreft** ya da allojenik greft türleri aynı , ancak genetik olarak farklı iki birey arasında yapılan doku transferidir. **Xenogreft** ise, bir türden farklı bir türe yapılan doku naklidir**.** Greftlerin yerleşimine göre ortotopik (anatomik olarak kendine özgü sahaya konulmuşsa) veya heterotopik (anatomik olarak farklı sahaya konulmuşsa) olarak tanımlanabilir.

2.2.FÜZYON ENDİKASYONLARI VE TEKNİKLERİ

Vertebra stabilizasyonunda ilk kullanılan cerrahi füzyon yöntemi deneylerle başlamıştır. 1900-1910 ‘da Lange, Almanya’da çelik teller kullanarak vertebral stabiliteyi sağlamaya çalışmıştır. 1911’ de Albee ve Hibbs‘in kemik greftler kullanarak yaptıkları füzyonları bildirmeleri, vertebral füzyon için dönüm noktası olmuştur.

2.2.1 Füzyon Endikasyonları

Spinal füzyon Hibbs ve Albee tarafından tanımlanmasından bu yana, omurga artrodezi tüberkülozda ve diğer infeksiyonlarda, kırıklarda, skolyoz ve kifoz gibi doğumsal ve gelişimsel omurga deformitelerinde, artritik ve diğer dejeneratif hastalıklarda ve disk lezyonları gibi pek çok durumda uygulanmaktadır.

2.2.2 Füzyon Teknikleri

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

2.2.2.1. Posterior Füzyon

Hibbs tarafından 1911 yılında ortaya atılan prensiblere dayanmaktadır. Omurganın arka elemenlarının füzyonudur. Hibbs ameliyatında nöral arkların füzyonu, bitişik laminalardan, spinöz proçeslerden ve artiküler fasetlerden çok sayıda küçük kemik flepler kaldırılarak indüklenir. Torakal omurgada artrodez, genellikle laterale, transvers proçeslerin uçlarına doğru uzatılır. Dejeneratif omurga hastalıkları tedavisinde en sık kullanılan cerrahi yöntemdir. Bu hastalarda konservatif tedaviye göre ağrı sağaltımında üstündür. Posterior orta hat veya Wiltse paravertebral yaklaşım ile yapılabilir (10,18).

Dezavantajları:

1-Kaynamama 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.

2.2.2.2 .Posterolateral veya İntertransvers Füzyon

Cleveland, Bosworth ve Thompson 1948 de spinal füzyondan sonra kaynamama tamiri için greftlerin posteriorda laminanın bir tarafına, artiküler fasetlerin lateral kenarlarına ve transvers tabanları üzerine yerleştirildiği bir teknik tanımlamışlardır. Ameliyat tek taraflı veya iki taraflı olabilir, fakat genellikle iki taraflıdır ve füzyon yapılacak bölgenin stabilitesine bağlı olarak bir ya da daha fazla eklemi kapsayabilir. Posterolateral füzyon kaynamama onarımından başka, dejeneratif spondiloartritte de kullanılmıştır (10,18).

Cerrahi komplikasyonunun az olması ile birlikte, solid füzyon oluşma oranının yüksek olması avantajı olarak değerlendirilmiştir (10,60).

2.2.2.3. Lateral Füzyon

Supraspinöz ve interspinöz ligamanlara zarar vermemesi tekniğin avantajı, orta hat posterior yaklaşımlarla kıyaslandığında apofizyal ekleme ulaşımın zor olması ise dezavantajı olmuştur (11).

2.2.2.4. Anterior Füzyon

İlk defa 1931 yılında Capaner tarafından tanımlanmıştır. Capaner transperitoneal yolla L5-S1 arasına ulaşmıştır ve L5 cisminden S1 'e doğru bir greft çakmıştır. 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 (18,60).

2.2.2.5.Anterolateral füzyon

İki şekilde yapılır. Bunlardan biri lomber sempatik ganglionektomide olduğu gibidir. Diğeri için ise lomber birinci vertebra hizasından 20 cm uzunluğunda transvers bir insizyon yapılır. Bu insizyonun içinden 12. kosta greft olarak kullanılmak üzere çıkarılır. Daha sonra obliqus eksternus ve internus abdominis kaslarının liflerinin oblik ayrılmasıyla, transversus abdominus kasından liflerin transvers ayrılmasıyla geçilir. Fasia transversalis kesilir. Peritona varılır. Künt bir şekilde periton posteriora ve aşağı doğru diseke edilir. İliopsoas kasına varılır. Bu kas posteriora alınarak, vertebranın lateral yüzü ortaya konulur. Gerekiyorsa ortaya doğru ilerlenir. Bu metodla 12. kosta greft olarak kullanılabilir (10,18,60).

2.2.2.6. İnterbody Füzyon

Servikal bölgede uygulandığında, geçici ses kısıklığı ve yutma güçlüğü bilinen komplikasyonlarıdır. Lomber bölgede posterior laminektomiden sonra interbody füzyon, kafes yardımı ile otogreftlerle birlikte uygulanmaktadır. Nörovasküler yaralanmalar riskleri arasındadır. Ciddi komplikasyon olarak ise, karotid ve vertebral arter yaralanması bildirilmiştir (10).

2.2.2.7. Minimal İnvazif Anterior Füzyon

Birçok araştırmacı tarafından endoskopi yardımlı posterior füzyonlar için teknikler geliştirilmiştir. Video yardımlı torasik cerrahinin gelişmesi; genel cerrahi ve toraks cerrahisi alanlarında birçok ameliyattan sonra ağrıyı, hastanede kalış süresini ve iyileşme süresini azaltmada önemli ilerlemeler sağlamıştır. Bu teknikler, anterior omurga cerrahisine de uygulanmıştır. Uzun bir öğrenme eğrisi gerektirmesi ve komplikasyonlarının fazlalığı nedeniyle deneyimli cerrahlar tarafından yapılması gerekmektedir (10).

2.3.GREFT TÜRLERİ

2.3.1.Otolog Kemik Greftleri

Otolog greftler özellikle osteogenezisin primer amaç olduğu durumlarda tercih edilmektedir. Çünkü otogreftlerde osteonal ilerleme (creeping substitution) daha hızlı gelişir. Otolog greftler; kansellöz, damarlı (vaskülarize) olmayan kortikal, damarlı kortikal ve kemik iliği olarak kullanılabilir. Farklı derecelerde osteojenik, osteokondüktif ve osteoindüktif özellikleri mevcuttur.

2.3.2.Otolog Kansellöz Kemik

Otolog kansellöz kemik kuvvetli osteojenik, hızlı bir şekilde revaskülarize olup erken dönemde uygulandığı sahaya adapte olabilen greft türüdür. Otolog kansellöz kemik greftleri halen spinal füzyon, kemik kayıplarının doldurulması ve kırık tedavisinde kemik iyileşmesini sağlayan en etkili greft materyali olarak bilinir (26). Otojen kansellöz kemik içinde osteojenik kemik ve kemik iliği hücreleri, osteokondüktif kollajen ve mineral matriksi, matriks proteinleri ve osteoindüktif matriks proteinleri nakledilir. Otolog kansellöz kemik iyi bir boşluk doldurucudur, fakat istenilen yapısal desteği tam olarak sağlayamaz. Otolog kansellöz kemik grefti, 5-6 cm'den küçük kemik kayıplarının olduğu kaynamama tedavisinde yapısal uyum gerektirmeden kullanılır. Bu greftler kemik kistlerinin doldurulmasında ve artiküler yüzeyin deplase olduğu tibia plato kırıkları gibi açık redüksiyon yapıldıktan sonra kemik boşluklarının doldurulmasında kullanılabilir (27). Burwell 196O'lı yıllarda yaptığı çalışmalarda, otogreft uygulaması sonrası gelişen yeni kemik dokusunda primitif osteojenik hücrelerin nakil sonrası hayatta kalarak ileri dönemde osteoblastlara dönüştüğünü göstermiştir (28). İliak kanattan, Gerdy tüberkülünden, radius distal ucundan ve tibia

distalinden otojen kansellöz kemik grefti alınabilir (29). Majör komplikasyonlar %8,6 minör komplikasyonlar ise %20,6 olarak rapor edilmiştir. Greftin sınırlı miktarda alınabilmesi kullanım açısından problem yaratır (22-25-30). Ameliyat süresinin uzaması, istenilen biçim ve boyutlarda hazırlanabilme güçlüğü ve alıcı sahada ameliyat yarası kalması hastalar açısından tekniğin olumsuz yönleridir.

Otojen kemik grefti uygulamaları sırasında karşılaşılan problemler nedeniyle alternatif greft materyalleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Kemik greftinin yerini tutabilecek ideal ajan; biyo-uyumlu, biyo-çözünür, osteokondüktif, osteoindüktif, yapısal olarak kemiğe benzer, kolay kullanılabilir ve ekonomik olmalıdır (21,29).

2.3.3.Damarlı Olmayan Otolog Kortikal Kemik

Otolog kortikal kemik kaynakları fibula, kaburga ve iliak kanattır. Bu greftler vasküler pediküllü veya pedikülsüz nakledilebilir (27). Kortikal kemik greftleri, otojen kansellöz kemik greftlerine göre biyolojik uyum olarak daha az başarılıdır. Kortikal kemik alıcı sahada mükemmel yapısal destek sağlayan bir otogrefttir. Kortikal kemiğin porozitesinin az olması nedeniyle damarsal yapıların greftin içine doğru ilerlemesi zor ve yavaştır. Kortikal kemik, trabeküler kemiğe göre daha az sayıda osteoblastik progenitor hücre içerir. Kortikal kemikteki hücreler, oksijen difüzyonu ve besin aktarımının az olması nedeniyle nakledilmeye daha az dirençlidir (25).

Kortikal kemik greftlerinin başlıca avantajları; mekanik olarak dayanıklı olmaları ve büyük kemik kayıplarının doldurulmasında miktar olarak yeterli olmalarıdır (25). 5-6 cm'in üzeri kemik kayıplarında otolog kortikal kemik greftleri iyi seçenektir. Ancak 12 cm'nin üzeri kemik kayıplarında, damarlı olmayan greftlerin başarısız olma oranının %25-50 olması nedeniyle, damarlı greftler tercih edilir (29). Kortikal nonvaskülarize greftler, vaskülarize kortikal greftlere göre transplantasyonun ilk altı haftası rezorpsiyon ve revaskülarizasyonun sonucu olarak daha zayıftır (31,32).

Başarılı bir greft aktarımı; nakledilen dokunun orijinal doku kadar iyi işlev görmesi yani; mekanik bütünlülüğünü ve fonksiyonunu greft aktarımı sırasında ve sonrasında koruması anlamına gelir.

Kansellöz otogreftlerdeki hücrelerin çoğunluğu özellikle de trabeküler boşluktakiler greftleme sonrasında ölmesine rağmen, yüzeydeki osteoblastlar hayatta kalır ve yeni kemik oluşturmaya baslarlar. Kansellöz kemik poroz yapıda olduğu için alıcı sahadaki

damarlar, osteoblastlar ve osteoblast öncüleri greftte periferden merkeze doğru ilerlerler.

Damarların invazyonu ile birlikte osteoblastlar ölü trabeküllerin kenarlarında dizilirler ve osteoid yapmaya başlarlar ve ölü kemiğin merkezine kadar osteoid ile kaplarlar. Ardından yeniden yapılanma başlar ve yeni oluşan kemik ve aralarda kalan nekrotik kemik adacıkları osteoklastlar tarafından rezorbe edilir ve yeni oluşturulan kemik ile yer değiştirilir. Sonrasında da mekanik güçler dogrultusunda şekillenir. Bu süreç yaklaşık 6 ay ile 1 yıl arasında tamamlanır (33). Kortikal greftlerin periostunda osteojenik potansiyeli olan az sayıda hücre canlı kalabilmiş olsa da greftteki osteositlerin çoğunluğu nakil sonrasında ölür ve kalan matriks, alıcı sahadan gelen ve osteojenik özellikleri olan hücrelerin üzerine yerleşebilecekleri bir cansız iskelet görevi görür. Nekrotik trabeküllerden oluşan iskeletin üzerine yeni kemik oluşumu ve ardından nekrotik yapıların rezorbsiyonu ile onarılan kansellöz kemik greftlerinin aksine, kortikal greftler yeni kemik oluşumu öncesinde nekrotik osteonların resorbsiyonuna ihtiyaç duyarlar. Bu da kortikal greftte porozitenin artmasına ve torsiyonel dayanıklılığın azalmasına yol açar.

Sonuçta, yeniden damarlanma ve onarım için oluşan kortikal porozite, özellikle büyük kortikal greftlerde görülen greft kırılması, kaynama gecikmesi ya da kaynamama sorunlarının görülmesindeki en önemli nedenlerdendir. Kortikal greftler baslangıçta yapısal dayanıklılığa sahiptirler. Fakat 6 ile 18 ay arasında süren yeniden damarlanma ve yeniden yapılanma evrelerinde gücünün yaklaşık üçte birini kaybeder. Zaman içinde normal yapısına yaklaşarak yaklaşık iki yılda normal kortikal kemiğin gücüne ulaşır. Yine de greftin içinde yer yer rezorbe olmamış canlı olamayan kemik adacıkları varlığını sürdürür (33,34).

2.3.4.Damarlı (Vaskülarize) Otogreftler

Mikrocerrahi tekniklerinin ilerlemesi ile damarlı otogreftler sık kullanılmaya başlanmıştır. Transplantasyon sırasında hem arter hem de veni anastomoz edildiğinde, osteositlerin yaklasık %90'ı hayatta kalır ve inkorporasyon ve kaynama için kemiğin osteoklastik rezorbsiyonu görülmez.

Damarlı olmayan otogreftlerdeki gibi rezorbsiyon ve ardından osteokondüksiyon ve remodelasyon izlenmez ve bundan dolayı damarlı olmayan otogreftlere göre ilk altı

haftalık dönemde daha dayanıklıdırlar. Bu greftler, yapısal bütünlüklerini kaybetmeden inkorpore olur ve nakledildikleri alanın mekanik özellikleri ve Wolf kanunları dogrultusunda hipertrofiye olurlar. Greft alınabilecek bölgeler fibula, kosta, tibia, olekranon ve iliak kanattır, fakat en sık tercih edilen damarlı fibula greftidir (23, 25, 30). Her bölgenin kendine özgü dezavantajları ve morbiditesi olmakla beraber, genelde donör saha problemleri ve ameliyat süresinin uzun olması önde gelen sorunlardır. Tang ve ark. serbest damarlı fibula grefti uyguladıkları 39 hastanın degerlendirmesinde greft alınan ekstremitede objektif olarak ciddi bir sorunla karsılaşmazken, %42 hastada subjektif instabilite hissi ve %37'sinde subjektif güçsüzlük bildirmişlerdir(35). Sadece hastaların %2 sinde donör saha probleminden dolayı tekrar ameliyat gerekmiştir. Altı cm üzerindeki defektlerde kemik transportunun daha iyi bir seçenek olabileceği belirtilmiştir (36, 37).

2.3.5 Kemik iliği

Bir diğer otolog materyal içerisinde bol osteoblastik hücrenin bulunduğu kemik iliğidir. Otolog kemik iliği enjeksiyonu ile transplante edilen hücrelerle osteojenik etki ve salgılanan sitokinlerden ve growth faktörlerden osteoindüktif etki gözlenir. Aspirasyon sonrası elde edilen kemik iliği; sitokinler, diger kemik iliği kökenli hücreler gibi osteoblastik progenitorler ve hızlı revaskülarize olan emilebilir biyolojik fibrin matriks içerir. Muschler ve ark., iliak kanattan aspire edilen kemik iliğini periferik kan ile 20-40 kat seyrelttikten sonra aspirat başına ortalama 1000 -1400 bağ dokusu progenitörü bulunduğunu görmüşlerdir (38). 2-5 ml kemik iligi içerisinde genç hastalarda 50000'de bir, yaşlı hastalarda 2x106 hücrede bir adet osteoprogenitör hücre olduğu düşünülür. Kemik iliği aspirasyon sonrası hemen kullanılmalıdır. Connoly ve ark, tibia kaynamaması olan 20 hastada intramedüller çivi ve perkütan kemik iliği enjeksiyonu uygulamış ve 18 olguda başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. Kemik iliği, diğer materyaller ile karıştırılarak kullanıldığında, tedavi yanıtını arttırabilir (39).

2.3.6.Allogreftlerin Genel Özellikleri

Tümör rezeksiyonları, revizyon ameliyatları ve uzun posterior spinal füzyonlarda otogreftler yetersiz kalmış ve farklı kaynaklardan sağlanabilen kemik greftlerine ihtiyaç duyulmuştur. Bu nedenle allogreftler kullanılmıştır. Allogreftlerin yerleştikleri zemine uyumları otogreftlere göre daha farklıdır. Bu uyum greftin boyutu, grefte karşı oluşan

immün yanıt, greft içindeki osteojenik hematopoetik hücreler, lökositler, kan damarları, sinir ve bağ doku matrikslerindeki histokompatibilite antijenlerine alıcının duyarlanması yanıtına bağlıdır. Bu yanıt sekonder karakterde bir immün yanıttır. Allografte konak dokunun verdiği cevap neticesinde, hem damar invazyonu hem de damar çevresi yeni kemik oluşumu daha yavaş gerçekleşmektedir (40,41).

Allogreftlerin standart otogreftlere göre avantajları şunlardır (25):

1. Otojen kemik alımı sırasında ortaya çıkan morbidite önlenir.

2. Otogreftin yeterli olmadığı büyük kemik kayıplarında yeterli miktarda greft sağlanır.

3. Otojen kortikal greftlere göre daha büyük miktar ve değişik boyutlarda allojen kortikal kemik sağlanabilir.

4. Jel, toz, fiber ve macun olarak birçok şekilde allogreftler işlenebilir. Bu da amaca yönelik kullanım kolaylığı sağlar. DKMleri, morselize ve kansellöz kemik yongalar, kortikokansellöz ve kortikal greftler, osteokondral greftler ve tüm kemik segmentleri gibi birçok değişik ürün elde edilebilir. Allojen kemik hazırlanması ve sterilizasyonu sırasında yapılan işlemler, kemiğin immunojenik etkilerini azaltırken, osteoindüktivite, osteokondüktivite ve mekanik özellikleri üzerinde de etkilidir. Donorün sağlık durumu ve bulaşıcı hastalık bulunup bulunmadığı tespit edildikten sonra ölümü takiben 24 saat içinde greftler alınır. -20° C derecede 1 yıl veya daha fazla süre saklanarak immunojenik etkiler azaltılır; ancak ortadan kaldırılamaz. Dondurarak kurutma ("freeze drying") işlemi ile immünojenite daha da azaltılır. -20°C derecede saklanan taze donmuş (fresh frozen) kemiklere göre, dondurarak kurutma sonrası elde edilen allogreftlerde mekanik dayanıklılık % 50 daha azdır.

Tıbbi malzemelerin gama irradyasyonu ile sterilizasyonu için CJ uluslararası Atom Enerji Ajansı tarafından önerilen doz 25000 gray'dir. Fideler ve ark., taze donmuş kemik- patellar tendon-kemik allogreftinin sterilizasyonun 30000 gray veya üstü gama irradyasyonu ile yapılması gerektiğini; bu doz ve üzerinde HIV'in dokuda saptanmadığını vurgulamışlardır (42). Gama irradyasyonun kemik greftin kırılganlığını arttırdığı gösterilmiştir. Cornu ve ark. farklı yöntemlerle sterilize edilen kemik allogreftlere göre, dondurulup kurutulan ve gama ışınları ile sterilize edilen greftlerin daha kırılgan ve daha sert olduğu gösterilmiştir (43). Bu nedenle gama ışınlarının dozu

arttıkça kemik allogreftin dayanıklılığı azalacak ve kırılganlığı artacaktır. Kimyasal sterilizasyon ethylen okside ve B-propiolactone ile sağlanır (41).

Masif allogreftler ile rekonstrüksiyon planlanırken, daha az kırılgan olmaları nedeniyle taze dondurulmuş allogreftler, dondurulup kurutulan allogreftlere tercih edilmelidir. Bununla beraber; saklanmaları ve taşınmaları esnasında soğuk zincir gerekmesi, bakteriyel- viral enfeksiyon riski ve yüksek maliyeti (elde etme ve saklama koşulları nedeniyle) dondurulup kurutulmuş allogreftlere göre dezavantajlarıdır.

2.3.7.Morselize ve Kansellöz Allogreftler

Morselize ve kansellöz allogreftler, osteokondüktiftirler ve kompresyona karşı mekanik olarak destek sağlarlar. Dondurulup kurutularak (freeze-drying, lyophilization) ve vakumla paketlenerek kullanıma hazırlanırlar. Kemik kistlerinde küretaj sonrası oluşan kavitelerin doldurulmasında ve periartiküler metafiz kırıklarında eklem yüzeylerinin kaldırılması sonucu olusan kemik boşlukların doldurulmasında morselize allogreftler kullanılabilir. Morselize allogreftler, otojen greftler ile karıştırılarak, uygulanacak greft miktarını arttırmak için de kullanılabilir. Morselize ve kansellöz allogreftlerin inkorporasyonunda aynı otogreftlerdeki basamaklar oluşur ancak kansellöz allogreftler, canlı hücre içermediğinden sadece osteokonduktiftir. Matriksleri mineralize olduğundan osteoindüktif değillerdir. Mineralize olduklarından mekanik destek sağlarlar ve aynı sebepten kompresyona dirençlidirler (26).

2.3.8. Demineralize Kemik Matriks

Demineralize Kemik Matriks (DKM), osteokondüktif ve farklı derecelerde osteoindüktif bir materyal olarak kemik kayıplarını ve boşlukları doldurmak için kullanılır. DKM hızlı bir şekilde yeniden damarlanır ve aynı zamanda otolog kemik iliği için iyi bir taşıyıcıdır. Urist ve ark. tarafından tarif edilen ve daha sonra Reddi ve Huggins tarafından geliştirilen standardize edilmiş yöntemle DKM elde edilir. Bu yöntemde allojen kemik 74-420 *jxm* partikül büyüklüğüne erişene kadar ezilir ve ardından üç saat 0,5N HCL mEq/gr'da demineralize edilir. Kalan asit steril su, etanol ve etil eter ile yıkanır (44-45). DKM elde etme aşamalarına göre (demineralizasyon zamanı, asit uygulaması, ısı, yağdan arındırıcı ajan uygulamaları ve gama ışınları veya etilen oksit ile sterilizasyon) doku bankaları ve firmalar arasında farklılıklar bulunur(29).

DKM'nin biyolojik aktivitesi, ekstrasellüler matrikste bulunan proteinler ve büyüme faktörleri ile olur. DKM'nin osteoindüktif kapasitesi; kemiğin işlenmesi, saklama şekli, sterilizasyon yöntemi ve donöre göre değişebilir. Ürün; dondurulmuş-kurutulmuş toz, ezilmiş granüller veya yongalar, jel veya macun şeklinde kullanılabilir (29). Gliserol, hyaluronik asit, kalsiyum sülfat ve jelatin ile karıştırılarak bu formlar elde edilir. DKM, içeriği ile kemik formasyona dönüşümü artıran mükemmel bir greft materyalidir. Kemik kisti ve kavitelerini mükemmel şekilde doldurur (46,47,48). DKM'in bir diğer uygulama alanı uzun kemik kaynamama ve akut kemik defektleridir. Bu uygulamalardaki başarı oranı otolog kemik greftlerine yakın ve benzerdir (46,49,50). DKM vertebra ve diğer bölge artrodez iyileşmesini artırmak için kullanılabilir (45,46). En başarılı greft materyali belki DKM ve otolog kemik iliği bileşiğidir (46,51).

Kemik kaybı büyük olduğu zaman otolog kemik greftini arttırmak ve yoğunlaştırmak için DKM, kansellöz greft ile karıştırılarak kullanılabilir. Aynı zamanda otolog kemik grefti kullanılamayan hastalarda alternatif olarak düşünülebilir. Yine perkütan olarak DKM ve otolog kemik iligi kullanımı bu tip olgularda göz önünde bulundurulmalıdır (29).

DKM bazı dezavantajlar da taşımaktadır. Allojen bir madde olması nedeniyle HIV (Human immunodeficiency virüs) bulaştırma riski taşır. Ancak alıcı seçimi sırasında yapılan değerlendirmeler ve dekalsifikasyon işlemi esnasında virüsün inaktive olması sebebiyle bu risk çok düşüktür. Bugüne kadar yapılan yayınlarda DKM kullanımı sonrası HIV geçişi bildirilmemiştir.

2.3.9.Osteokondral ve Kortikal Allogreftler

Osteokondral ve kortikal allogreftler pelvis, kostalar, femur, tibia ve fibuladan elde edilerek majör kemik ve eklem kayıplarında kullanılırlar. Ekstremite koruyucu cerrahiler sonrası, büyük kemik kayıplarını rekonstrükte etmek için sık olarak kullanılırlar. Ayrıca periprostetik kırıkların tedavisinde hem yapısal hem de mekanik destek sağlarlar. Osteokondüktif özellik taşıyan bu greftler, derin dondurularak veya dondurulup kurutularak saklanabilirler. Derin dondurulmuş allogreftler materyal özelliklerini korurlar ve eritildikten sonra hemen kullanılabilirler. Ancak dondurulup kurutulan allogreftler rehidratasyon sonrası uygulanmalarına rağmen torsiyon ve eğilme kuvvetlerine karşı zayıftırlar. Kortikal allogreftlerin uygulanmasından sonraki erken

inflamasyon safhası, diğer bütün greftlerde olduğu gibidir. Vasküler invazyon başlar, inflamatuar hücreler sahaya toplanırlar. Bu sürede alıcı, graft-derived hücresel antijenleriyle karşılaşır ve bunlara sensitizasyon geliştirir. Modern işlemlerden geçirilmiş olan allogreftler genellikle çok az protein ve birkaç hücre içerirler. Bu kemiğe yerleştirildiğinde, cerrahiden birkaç gün sonra travmaya bağlı, nonspesifik post-operatif inflamasyon başlar.Kortikal allogreftler kan damarları tarafından penetre edilir ve yerini yavaş yavaş, yüzeyel ve sınırlı derecede alıcı kemiğe bırakır (52). Osteokondral ve kortikal allogreft uygulamaları sonrası, düşük de olsa HIV enfeksiyonu riski bulunmaktadır.

ABD'de HIV virüsü tanımlandıktan sonra 3 milyon doku transplantasyonu yapılmıştır ve taze donmuş allogreft uygulanan iki vakada HIV virüsü saptanmıştır (29). Taze allogreftlerde herhangi bir işlem uygulanmadığından belirgin immün reaksiyon meydana gelme riski vardır ve bu da onları otogreftlerden daha az etkili kılar. Taze allogreftlerin kullanımı sınırlıdır, eklem yüzeyi rekonstrüksiyonu için kullanılabilmektedir (29).

2.3.10.Seramik Matriksler

Hidroksiapatit ve trikalsiyum fosfat (TCP) gibi kalsiyum fosfat birleşikleri seramik matriksler olarak adlandırılırlar. Kalsiyum sülfat tuzları da bu gruba dahil edilebilir. Bu materyaller üç gruba ayrılır

1. Hızlı rezorbe olan seramikler

2. Yavas rezorbe olan seramikler

3. Enjekte edilebilen seramik çimentolar(19)

2.3.11.Hızlı Rezorbe Olan Seramikler ve Kalsiyum Tuzları

Poroz TCP implantları, TCP tozlarının naftalin gibi taşıyıcılar kullanıldıktan sonra sıkıştırılması ile elde edilir. Elde edilen poroz yapı %35 oranındadır ve oluşan porlar 100-300 *jjum* boyutlarındadır. TCP, hidroksiapatite göre daha hızlı çözünür ve rezorbe olur. Gözenek yapısının çok küçük olması ve gözenekler arasında bağlantı bulunmaması nedeniyle rezorpsiyon olmadan kemik hücreleri yapının içine ilerleyemez. Bu yüzden TCP'nin granül formu kemik grefti olarak daha kullanışlıdır (25).Kalsiyum fosfat tuzları vücuda yabancı cisim reaksiyonu çıkarmaz. Vücut tarafından iyi tolere edilir. Kalsiyum

fosfat seramikleri değişik boyutlarda gözenekli ve gözeneksiz bloklar şeklinde elde edilebilir. Yüksek kalsiyum fosfat iyon konsantrasyonu içeren yüzeyler ve lokal mikroçevre, TCP rezorpsiyonunu etkiler. TCP'nin bulunması ve kalsiyum fosfat kristallerinin lokal depolanması osteoklastları uyarır. Osteoklastik aktivitenin artması ile osteoblastik aktivite de artacağı için yeni kemik oluşumu meydana gelir (25).

2.3.12.Yavaş Rezorbe Olan Seramikler

Klasik yavaş rezorbe olan kalsiyum fosfat seramik örneği hidroksiapatittir. Coralline hidroksiapatit hidrotermal değiştirme yöntemi ile coral kalsiyum fosfatın, kristalize hidroksiapatite dönüştürülmesi ile elde edilir. 200-500µm boyutundaki porları, insan trabeküler kemiğinin por yapısına göre oldukça küçüktür. Bucholz ve ark. klinik deneyimlerinin raporları doğrultusunda, eklem yüzeyi deplasmanı olan tibia plato kırıklarında hidroksiapatit ve otolog kansellöz kemik greftlerinin boşlukları doldurma oranı benzerdir (53). Hayvan ve insanlarda yapılan uygulamalar sonucunda hidroksiapatit poroz implantların fibrovasküler doku ile kaplandığı ve sonra lameller kemiğe döndüğü gözlenmiştir. Oluşan kemik otojen greftlere benzer görünümdedir (25). Klinik olarak hidroksiapatitin yavaş emilimi dezavantajdır.

Bu nedenle emilimini arttırmak için değişik uygulamalar geliştirilmiştir. Bunlar; kalsiyum karbonatın dış kabuğunun hidrotermal olarak hidroksiapatite çevrildiği implantlar, hidroksiapatitten elde edilen bifazik kalsiyum fosfat seramikler ve hidroksiapatit ile TCP karışımı olan kompozit materyaller olarak sayılabilirler (25).

2.3.13.Enjekte Edilebilen Seramik Çimentolar

Seramik çimentolar, a-TCP, dibazik dikalsiyum fosfat ve tetrakalsiyum fosfat monoksid karışımlarından oluşur. Maddeler sıvı macun seklinde karıştırılır ve ardından belirgin ısı oluşmadan kristalize olarak sertleşir. Bir miktar hidroksiapatit oluşsa da sertleşen çimentonun büyük kısmı saflaşmamış, kolay rezorbe olan kalsiyum fosfat seramik kristalleri içerir ve osteoklastlar tarafından remodelize edilir.

Meydana gelen sertleşmiş materyalin kompresif güçlere dayanıklılığı kansellöz kemiklere eşdeğerdir (25).Histolojik olarak, implantasyon sonrası vasküler kanalların invazyonu ve birkaç hafta sonra osteoklastik aktivite gözlenir. Bunu yeni kemik oluşumu izler. Klinik olarak açık ve kapalı olarak kırık sahasına ve kemik kaybı olan bölgeye uygulanabilir.

Radius distal uç kırıklarında, humerus proksimal uç kırıklarında, vertebra kompresyon kırıkları tedavisinde enjekte edilebilen seramik çimentolar kullanılabilir (25).

2.3.14.Kollajen

Tip I kollajen, çapraz bağlı fibriler yapısıyla kemik ekstrasellüler matriksi içinde en fazla bulunan proteindir. Kollajen, kemik oluşumunda ve mineral depolanmasında önemli bir proteindir. Yüzeyinde minerallerin depolandığı ve kollajen olmayan matriks proteinlerinin bağlandığı alanlar bulunmaktadır (25). Klinikte kullanımı bulunan saflaştırılmış sığır kaynaklı tip I kollajen matriks yapılarının (jel, toz ve poroz sünger) elde edilmesinde kullanılır (25). Osteoblastik progenitor hücrelerin ve diğer osteoprogenitör materyallerin uygulanmasında taşıyıcı olarak kullanılabilir (22). Kollajenin, seramik granüller, kemik morfojenik proteinler ve osteblastik progenitor hücrelerin taşınmasında etkili olduğu gösterilmiştir. Werntz ve ark., tek başına kollajenin fare femurlarında diafiz kayıplarının iyileşmesinde etkisiz olduğunu; ancak kemik iliği ile birlikte kullanıldığı zaman otolog kansellöz greftlemeye göre üstün olduğunu göstermişlerdir (54). Johnson ve ark., kemik kaybı modelinde kollajen jel, bifazik seramik hidroksiapatit ve TCP'den oluşan kompozit kullanımının tek başına seramik kullanımına göre kemik oluşumunu belirgin olarak arttırdığını göstermişlerdir (55).

2.3.15.Kalsiyum – kollagen greft materyalleri

Bir diğer seramik greft materyali güncel klinik kullanımda olan kalsiyum – kollajen greft materyalidir Bu osteokonduktif bileşik; hidroksiapatit, trikalsiyum fosfat ve Tip- I ,III kollajen ve otolog kemik iliğinin sağladığı osteoprogenitör hücreler ve büyüme faktörlerinden oluşur. Bu bileşik yapısal destek sağlamaz ancak akut kemik iyileşmesini artırmak için kemik grefti olarak veya kemik greft genişletici olarak işlev görür.

2.3.16.Biyoaktif Camlar

Değişik şekillerde biyoaktif camlar, periyodontal cerrahide kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Bu materyal; silikon dioksit (%45), kalsiyum oksit (%24,5), disodyum oksit (%24,5) ve pirofosfattan (%6) oluşur. Uygulandığı zaman kollajen, büyüme faktörleri ve fibrine bağlanarak osteojenik hücrelerin ilerlemesini sağlayan poroz matriks oluşturur (29). Granül, blok ve çubuk seklinde ürünler vardır. Absorbe olan ve

olmayan tipleri bulunur. Antibiyotikler ile ve kemik yapımını arttıran maddeler ile karışım halinde kullanılamazlar. Hidroksiapatit implantlardan daha dayanıklıdırlar (23).

2.3.17.Cam iyonomerleri

İyonomerik çimento, kalsiyum-aluminyumflorosilikat cam tozunun, polikarboksilik asit ile karıştırılması sonucu elde edilir. Polimerizasyon esnasında ekzotermik reaksiyon oluşmaması nedeniyle kemik çimentosundan üstündür. Toz formunda bulunur ve rezorbe olmaz. Antibiyotik ve kemik oluşumunu uyaran maddeler ile karıştırılabilir. Kompresif gücü ve elastisitesi kortikal kemik ile eşdeğerdedir (23).

2.3.18.Aluminyum Oksit

Aluminyum oksit, birkaç biyoaktif materyalin karışımından oluşur. Ancak tek başına greft olarak kullanılmaz. Aluminyum seramikler, biyoaktif camlar gibi implant ve kemik arasında iyon değişimi yapmazlar. Bu yüzden osteointegrasyonu sağlayamazlar. Bunun yerine, implantın üzerindeki streslere bağlı olarak, çevreleyen kemikle arasında mekanik bir bağ oluşur. Aluminyum seramikler çok sert ve katıdırlar. Eğilmeye bağlı kırılmaya karşı seramikler, hidroksiapatitlere göre çok daha dayanıklıdırlar. Granül ve blok formları bulunur. Rezorbe olmazlar. Antibiyotik ve kemik oluşumunu uyaran maddeler ile karıştırılamazlar. Kemik greftini genişletmek için, açık kama osteotomilerinde, eklem protezlerinde kaplama olarak kullanılırlar (23).

2.3.19.Kemik Morfojenik Proteinleri (BMP)

Kemik morfojenik proteinleri, düşük molekül ağırlıklı kollajen olmayan glikoproteinlerdir. Bu protein ailesi çok sayıda büyüme ve farklılaşma faktörü içeren bir grup olan TGF-ß (transforme edici büyüme faktörü-ß) grubuna dahil olan dimerik moleküllerden oluşmaktadır. BMP adı ile anılan BMP-2'den BMP-8'e kadar yedi üyesi olmasına rağmen osteojenik proteinler, kıkırdak kaynaklı morfojenik proteinler ya da büyüme ve farklılaşma faktörleri gibi çeşitli isimlerle anılan otuzdan fazla molekül bu aile içinde yer almaktadır ve hepsi birlikte TGF-ß grubunun üçte birinden fazlasını oluştururlar. Kemik morfojenik proteinleri, tüm kemik proteinlerinin ağırlık olarak %0,1'ini oluştururlar. DKM, kemik morfojenik proteinlerinin karışımından oluşur ve immünojeniktir. Ancak saf BMP, immünojenik ve türlere özgü değildir. Rekombinant gen teknolojisi ile kemik morfojenik proteinleri ayrı ayrı üretilmiştir. Klinik kullanımda

ise BMP karışımları saflaştırılmış kemik ekstrelerinden elde edilmektedir. Çalışılmakta olan rekombinant BMP'ler; rh-OP-1 (osteojenik protein 1), rh-BMP-2 ve rh-BMP-7'dir.

Boden ve ark., lomber spondilolistezli 14 hastada, metal kafeslerin içine rhBMP-2/ kollajen (11hasta) ve otogreft (3 hasta) yerleştirerek spinal füzyon uygulamışlardır. rhBMP-2/ kollajen kullanılan 11 hastada altıncı ayda füzyon saptanırken, diğer üç hastanın ikisinde füzyon birinci yılda olmuştur (56).

Gelecekte BMP'ler revizyon artroplastisinde, femur başı avasküler nekrozunda, omurga füzyonunda ve enjekte edilebilir formlarıyla minimal invaziv cerrahide yaygın kullanım alanı bulacaktır (56).

2.3.20. Diğer Büyüme Faktörleri

Kemiğin ekstrasellüler matriksinden elde edilen büyüme faktörlerinin (DKM, BMP) yanında, kan dolaşımında bulunan diğer büyüme faktörleri de kırık iyileşmesinde etkilidir. TGF-ß, kemik biyolojisinde en çok çalışılan büyüme faktörüdür. BMP'leri oluşturan molekül ailesinin tümünü kapsar. 1994 yılında rekombinant teknoloji ile ilk olarak elde edilmiştir ve kırık iyileşmesini hızlandırdığına ait çalışmalar bulunmaktadır (57).

Trombosit kaynaklı büyüme faktörünün (PDGF), tavşan tibialarında yapılan osteotomilerde kırık iyileşmesini uyardığı gösterilmiştir (58). Otolog büyüme faktörleri, cerrahi sırasında "cell saver" cihazı yardımıyla toplanan kan pıhtısından santrifüj sonucu elde edilirler. Bu madde özellikle TGF-ß ve PDGF'den zengindir. Diğer kırık iyileşmesine etkili faktörlerden temel fibroblast büyüme faktörünün de (bFGF) klinikte kullanımı bulunmaktadır(59).

2.4.BÜYÜME FAKTÖRLERİ

Literatürde, vertebralarda füzyonu hızlandırmak için sistemik mediatörler ve ekstrasellüler matriks elemanları kullanılarak çalışmalar yapılmıştır (5). Çalışmalarda; kemik yapımını osteoindüktif moleküllerin (kemik morfojenik proteinleri gibi) arttırdığı belirtilmiştir (61). Kemik defektlerinin iyileşmesinin moleküler yapısı incelendiğinde; omurganın dekortikasyonundan sonra oluşan hematom içindeki ve transplante edilen otojen kemik matriksi içindeki büyüme faktörleri osteoindüksiyonu başlatır. TGF-β ailesi, BMP-2, BMP-9, büyüme ile farklılaşma faktörleri, kemik defektleri

iyileşmesindeki en önemli büyüme faktörleridir (10). Kallus içindeki diğer büyüme faktörleri ise, FGF, PDGF, IGF-I ve IGF-II'dir. Bu faktörler farklılaşmamış mezenşimal hücrelerin migrasyonunu tetikler ve bunlar prolifere olarak kemik yapan hücrelere dönüşürler (10). TGF-β nın tek başına osteoindüksiyonu başlatma yeteneği yoktur. BMP ise, hücre dışı ve iskelet organogenezisinden 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 (10). Heparin sülfatlar, heparin bağlayıcı büyüme faktörleri, heparin sülfat proteoglikanları gibi ekstrasellüler matriks elemanlarının da kemik defektlerinin iyileşmesini olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir (11).

2.5. AMNİYON SIVISI

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

İnsan amniyon sıvısı, gelişimde kritik rol oynayan, EGF, FGF, IL-1 ve IL-2 gibi büyüme ve trofik faktörlerden zengindir (8,11,62). Ek olarak insan amniyon sıvısından hyaluronik asit, hyaluronik asit aktive edici faktör, heparan sülfat, dermatan sülfat, chondroitin 4-ve 6-sülfat da ayırt edilmiştir (63). Bu faktörlerin kıkırdak iyileşmesinde etkili olduğu bilinmektedir.

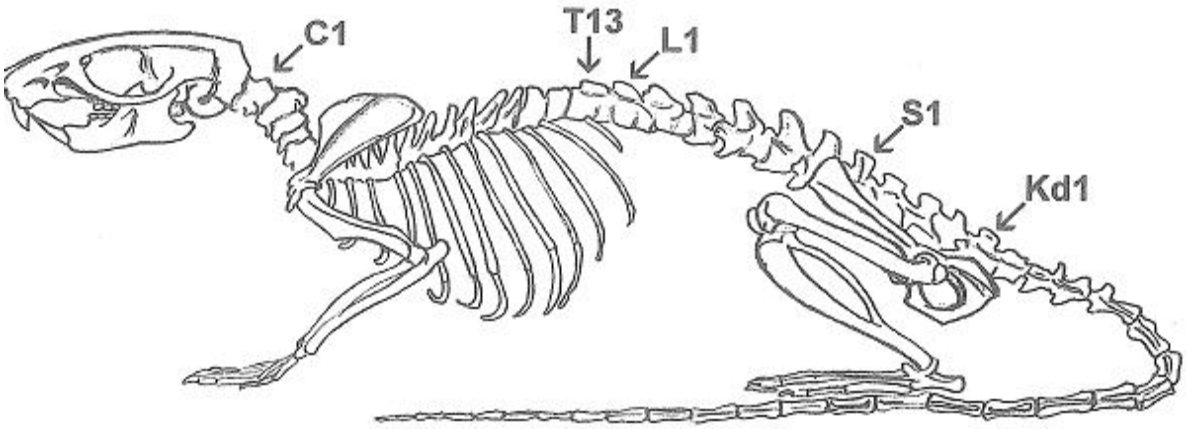
Yüksek molekül ağırlıklı lineer polisakkarit olan hyaluronik asit; konnektif dokular ve vücut sıvıları gibi birçok dokuda bulunur. Hyaluronik asit embriyonik gelişimde önemli rol almaktadır (64). Mid –gestasyon döneminde, insan amniyon sıvısındaki hyaluronik asit konsantrasyonu gestasyonun son dönemine göre yirmi kat olduğu gösterilmiştir (63). Aynı zamanda amniyon sıvısı, HA ve HASA'dan da oldukça zengindir (11).

2.6.RAT ANATOMİSİ

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 ekstremite, pelvis ve alt ekstremiteyi 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 (Şekil 1). Spinal kord, erişkin erkek ratlarda 113-125 mm uzunlukta ve yaklaşık 0.7 gr ağırlıktadır (65). Ratın spinal kolonunun dolaşımı; abdominal aortun verdiği iliolomber dal tarafından düzenlenir. Spinal kordun venöz drenajı, uzunlamasına seyirli altı venöz kanaldan oluşur. Venöz pleksus ventralde dorsale göre daha geniş damarlardan oluşmaktadır (65).



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 vertebralar dışındakilerin sayıları sabittir (Hebel ve Stromberg, 1976).

Şekil 1. Ratın iskelet yapısı

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 09/06/2010 tarih ve (10/55) sayılı onayı alındıktan sonra başlandı. Çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nin araştırma fonu desteği ile gerçekleştirildi (Proje no: TSU-10-3280). Bu deneysel çalışmanın deney aşaması Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM) Labaratuarında, 18.09.2010-03.12.2010 tarihleri arasında yapıldı. Histolojik çalışmalar Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji laboratuvarında, biyokimyasal çalışmalar Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi biyokimya laboratuarında ve radyolojik görüntüler Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyoloji röntgen çekim merkezinde alındı.

3.1. Hayvanlar ve çalışma grupları

Çalışmada, ortalama ağırlıkları 250gr (200-300gr) olan, 24 haftalık, 72 adet Spraque Dawley cinsi, rat kullanıldı. Hayvanlar Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM)' nde 12-12 saatlik ışık-karanlık siklusunda, 20-24°C'de, üçerli gruplar halinde kafeslere yerleştirildi. Ratlar, günlük 15 gr rat yemi ve su ile beslendi, standart etik kurallara uyularak izlendi .

Ratlar herbiri 12 rattan oluşan altı gruba ayrıldı. GRUP I Otogreft (O), GRUP II Otogreft ve İnsan amniyon sıvısı (OA), GRUP III Allogreft (A), GRUP IV Allogreft ve İnsan amniyon sıvısı (AA), GRUP V DKM (D), GRUP VI DKM ve İnsan amniyon sıvısı (DA) olarak adlandırıldı. Ratların vertebralarının posteriorunda dekortikasyon yapıldıktan sonra Grup I 'e otogreft, Grup II 'ye otogreft ve insan amniyon sıvısı,Grup

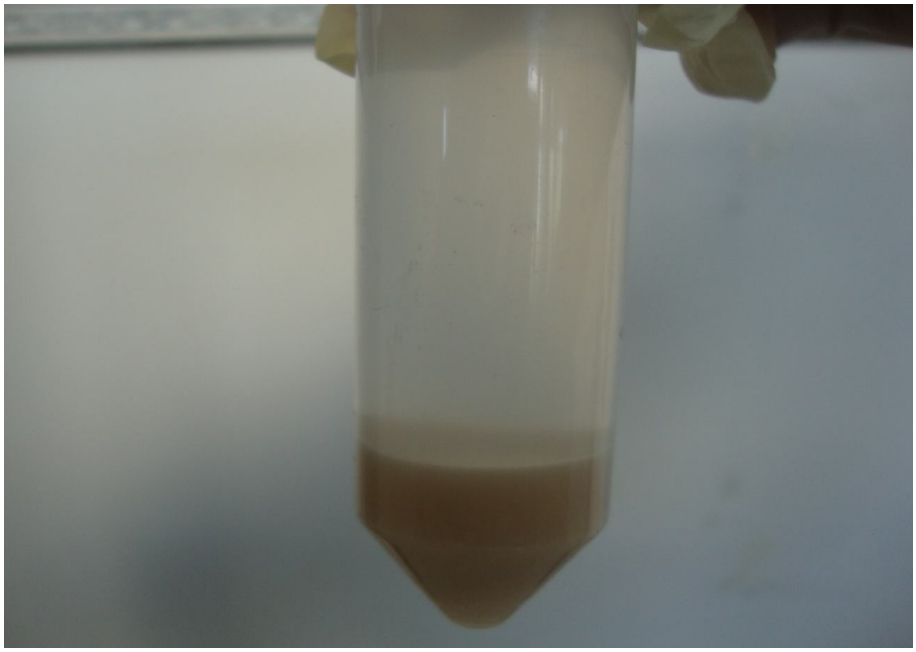
III'e Allogreft ,GrupIV'e Allogreft ve insan amniyon sıvısı ,Grup V 'e DKM,Grup VI 'ya DKM ve insan amniyon sıvısı verildi. Gruplarda yapılan füzyonların sonuçlarının değerlendirilmesi, radyolojik ve histolojik olarak yapıldı.

3.2. Allogreft ve DKM elde edilmesi

Allogreft ve DKM; 8 adet, deney grubu dışındaki ratların sakrifikasyonu sonucu elde edildi. Sakrifiye edilen ratların her iki iliak kanat ve her iki femur ve tibia kemikleri yumuşak dokularından sıyrıldı. İliak kanatlar allogreft elde etmek için kullanıldı (Resim 1). Femur ve tibia kemikleri bütün yumuşak dokularından tamamen temizlendikten sonra -70 °C de dondurulduu. Etilen oksit ile sterilize edildi. DKM elde etmek amacıyla 0,5 mm parçalara ayrıldı. Daha sonra 106-500 µm boyutlara kadar öğütüldü. 0,6 N HCL (100g /2 L) ile dekalsifikasyon işlemi 4 °C de 16 saat tutularak tamamlandı (Resim 2). Daha sonra materyaller steril su ile yıkandı. %70 etanol ile ıslatıldı. DKM bir gece vakum kurutma ile kurutuldu, etilen oksit ile sterilize edilip, -70 °C de saklandı.



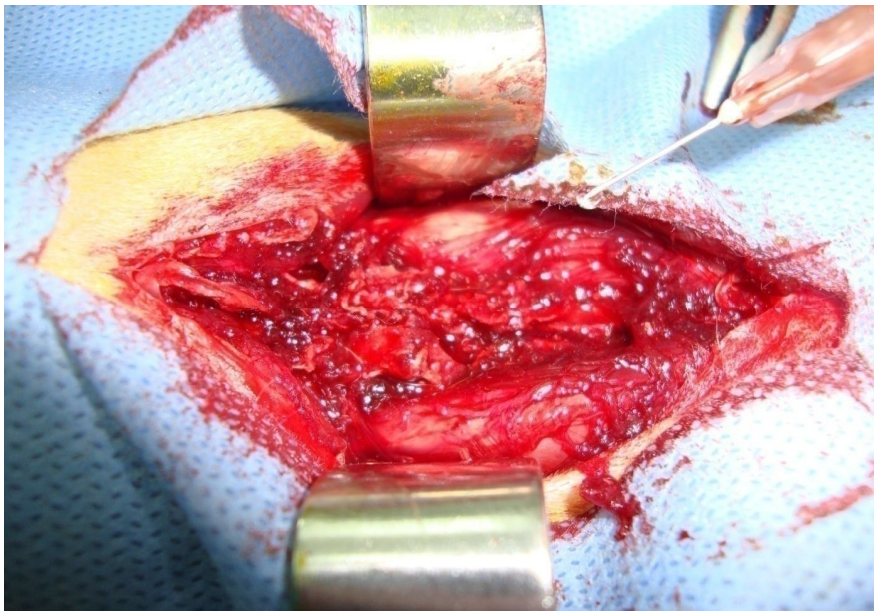
Resim 1. Ratlardan elde edilen allogreft.



Resim 2. DKMin elde edilmesi..

3.3. Amniyon sıvısı elde edilmesi

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kadın Doğum Polikliniği'ne başvuran ve 20.gebelik haftasını dolduran kadınlardan onam formu alınarak elde edilen 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 8 cc süpernatan kısım alındı. -20°C'de buzdolabında saklandı. Cerrahi sırasında kullanılacak amniyon sıvısı, oda sıcaklığında 20 dakika bekletilerek çözünmesi sağlandı. . Grup I, III, V e dekortikasyon ve sadece greftlerle füzyon uygulandı. Grup II, IV, VI ise dekortike edilen posterior spinal elemanlara, greftlerle füzyon uygulandıktan sonra elde edilen amniyon sıvısından 0.5 cc uygulandı (Resim3).



Resim 3. İnsan amniyon sıvısının greftlere uygulanmas

3.4.Vertebral füzyon

Anestezi sağlamak amacıyla; Ratlara xylazin hidroklorid (Rompun®; Bayer Healthcare, Leverkusen, Almanya) 10 mg/kg dan intraperitoneal ve ketamin hidroklorid (Ketalar®; Pfizer, İstanbul, Türkiye) 30 mg/kg dan intraperitoneal olarak yapıldı. Anestezi uygulanan ratlar, yüzüstü pozisyonda iken, cerrahi uygulanacak bölge traş edildi (Resim 4) ve %10'luk povidon iyot solüsyonu (Batticon®; Adeka, Samsun, Türkiye) ile boyandı (Resim 5). Steril örtüler ile örtülerek steril saha elde edildi

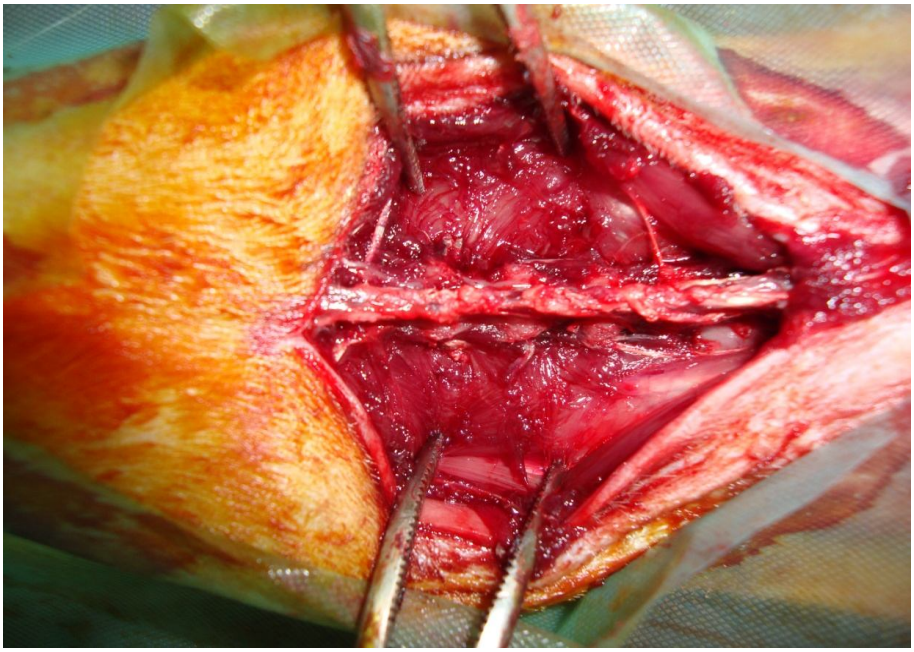


Resim 4. Ratların ameliyat hazırlığı

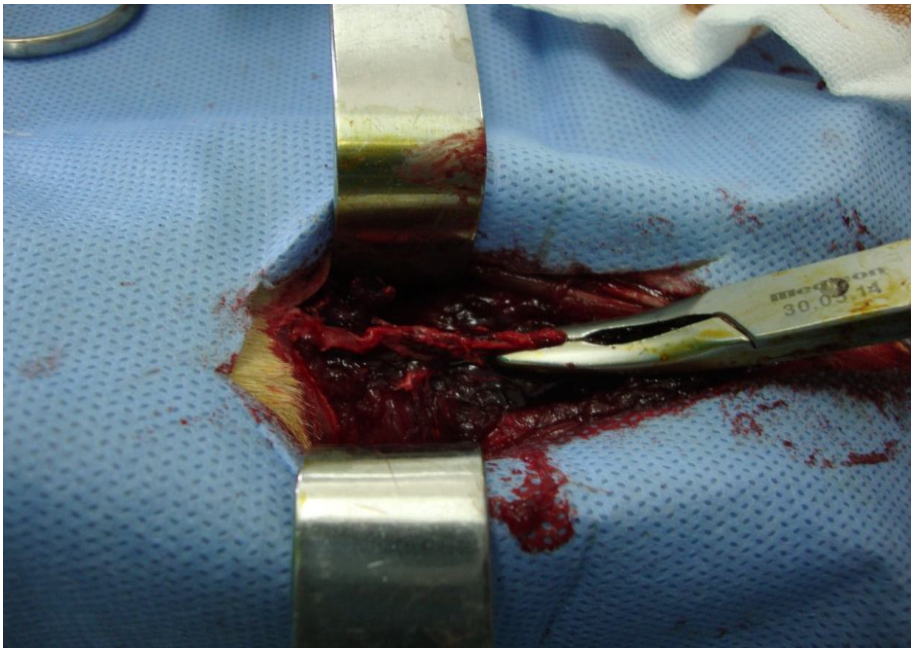


Resim 5. Ameliyat sahası hazırlığı.

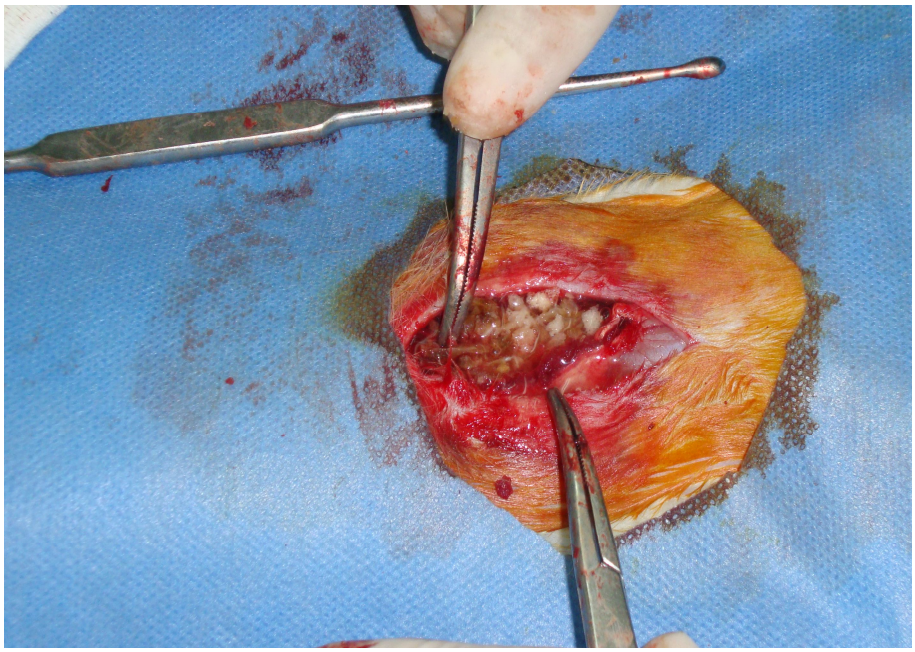
Lumbal bölgeye spinöz çıkıntılar üzerinden olacak şekilde, orta hat cerrahi insizyonu yapıldı. Cilt, cilt altı ve fasya geçildikten sonra, ratların posteriorunda yer alan longissimus lumborum kası kemikten sıyrılarak spinöz çıkıntılar ve transvers çıkıntılar ortaya kondu. Lumbal vertebralarda L4 - L6 ya spinal füzyon uygulandı. Lumbal vertebraların spinöz çıkıntıları rounger ile alınarak, kemikler yumuşak dokularından temizlendi. Transvers proçesler dekortike edildi (Resim 6). Greft konulacak olan lumbal bölge, rounger, küret ve ince burr ile dekortike edildi. Otogreft grubu olan ratların iliak kanadı traşlandıktan sonra, iliak kanattan otogreft temin edildi. Otogreft grubuna spinöz proçeslerden elde edilen greftlerle birlikte 1cm³ otogreft uygulandı (Resim 7). Dekortikasyondan sonra elde edilen allogreft ve DKM gruplarına 3cm³ allogreft ve DKM uygulandı. (Resim 8) Posterolateral füzyon tamamlandı.



Resim 6. Posterior spinal adelelerin sıyrılması.



Resim 7. Spinöz proçeslerin çıkarılması.



Resim 8: Allogreftlerin yerleştirilmesi

Vertebra üzerindeki kas tabakası 3,0 emilmeyen dikiş ipliği (Trofilen®; Doğsan, Trabzon, Türkiye) ile kapatıldı. Cilt 3.0 rapid vicryl ile kapatıldı. Ratlar kafeslerine kondu. Post operatif olarak tek doz sefazolin sodyum (İespor® ,I.E Ulagay, İstanbul, Türkiye) (70mg/kg) antibiyotik tedavisi uygulandı.

3.5.Cerrahi müdahale sonrası takip

İlk yedi gün boyunca hayvanların yara yeri pansumanı, klinik olarak lokal muayeneleri yapıldı ve takip edildi. Havyanlara herhangi bir şekilde immobilizasyon uygulanmadı.

Otogreft grubu ratlarda ölüm gözlenmedi. Allogreft grubu ratlarda iki adet rat ameliyat sonrası 1. haftada kaybedildi. DKM amniyon grubundan iki rat ameliyat sonrası 5. gün öldü. Bu hayvanlar çalışma kapsamından çıkarıldı.

3.6. Hayvanların sakrifiye edilmesi

Ratlar, 8. haftada yüksek doz eter anestezisi verilerek öldürüldü. Ratlara, servikal dislokasyon yapılmadı çünkü, servikal dislokasyon yaparak, uygulanacak distraksiyonun füzyonu etkileyebileceği düşünüldü. Ratlar, ameliyat masasına, alt ve üst ekstremitelerinden tutturuldu. Posterior orta hat insizyonuyla cilt, cilt altı ve kas tabaka geçilerek, füzyon hattına ulaşıldı. Füzyon bölgesi, proksimalinden ve distalinden füzyon

sahasına zarar vermemeye çalışılarak, kemik makası kullanılarak kesildi. Füzyon bölgeleri, içinde % 10 formol bulunan şişelere yerleştirildi.

3.7.Radyolojik inceleme

Sakrifikasyondan sonra çıkarılan füzyon alanlarının her birine bir numara verildi tüp uzaklığı 90 cm olacak şekilde, 30×24cm' lik röntgen kasedinin üzerine numara sırasına göre konularak, dijital olarak çekilen ön-arka grafilerle değerlendirmeye alındı. Radyografiler, deneklerde hangi tür greft konulduğunu bilmeyen, tek radyolog tarafından değerlendirildi. Radyolojik değerlendirme Lenkenin radyolojik değerlendirme skalasına göre (82) yapıldı (Tablo 1). Bu skalaya göre 4 puan ; bilateral büyük solid füzyon alanları, 3 Puan; Unilateral büyük- kontrolateral küçük solid füzyon alanları, 2 puan; Bilateral küçük solid olmayan füzyon alanları, 1 puan; Bilateral greft rezorbsiyonu veya bilateral kaynamama olarak belirlendi.

Tablo 1. Lenke sınıflandırmasına göre radyolojik değerlendirme skalası (82)

PUAN	**DOKU ÖZELLİĞİ**
4 puan	Bilateral büyük solid füzyon alanlarına
3 Puan	Unilateral büyük- kontrolateral küçük solid füzyon alanları
2 Puan	Bilateral küçük solid olmayan füzyon alanları
1 Puan	Bilateral greft rezorbsiyonu veya bilateral kaynamama

3.8.Histolojik inceleme

Sakrifikasyondan sonra radyolojik görüntüleri alınan örnekler, şişelerine formol sıvısı değiştirilerek geri kondu. %10'luk formaldehit içinde 24 saat bekletildi. 24 saat sonra formol solüsyonu tekrar değiştirildi. 80 gün oda sıcaklığında %10'luk formik asit içinde dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyon solüsyonu, bu süre içinde 3 günde bir değiştirildi. Örnekler, etanol serilerle dehidrate edildi, ksilen ile temizlendi ve parafine gömüldü. Mikrotom bıçağı kullanılarak, 5µm kalınlığında longitudinal kesitler yapılarak Hemotoksilen-eozin (H.E.) ile boyandı. Tüm kesitler Erciyes Üniversitesi Histoloji ve

Embriyoloji Anabilim Dalı tarafından ışık mikroskobu (Olympus BX-51) ile değerlendirilerek, mikro fotoğraflar çekildi. Histopatolojik değerlendirmelerde ise

Emery ve ark. kullandığı skala sisteminden (83) yararlanıldı (Tablo 2). Emery sistemine göre ise 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 olarak belirlendi.

Tablo 2. Emery sınıflandırmasına göre histolojik değerlendirme (83)

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

3.9.İstatistiksel Değerlendirme

Grupların ikili karşılaştırılmalarında, Mann-Whitney U testi kullanıldı. SPSS 13.0 Windows programı (SPSS Inc Chicago, Illinois) programı kullanılarak değerlendirme yapıldı.

Veriler skala özellikli olduğundan dolayı dağılım Medyan (Denge) olarak tanımlandı. Gruplar arasındaki farklılığa Kruskal Wallis Varyans analizi ile bakıldı ($p<0.05$). Hangi grubun farklı olduğuna ise Bonferroni düzeltmeli Man Whitney U testi ile bakıldı. Anlamlılık Seviyesi($p< 0.0083$) olarak alınd

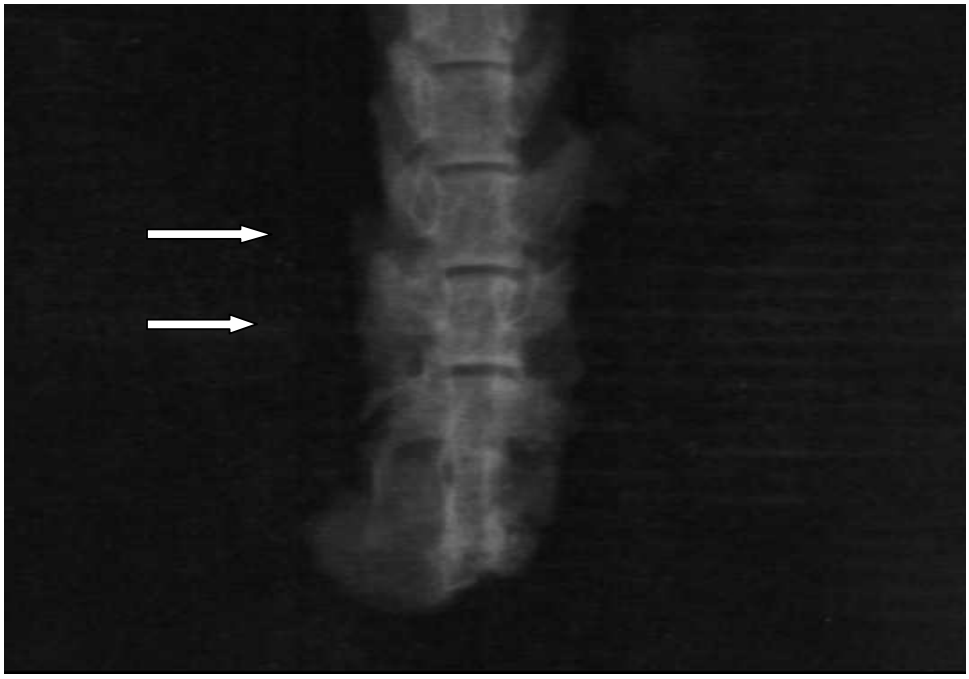
4.BULGULAR

Çalışmamızda, ratlarda insizyon bölgesinde kızarıklık yoktu. Cerrahi uygulanan bölgede akıntı yoktu. Amniyon sıvısı grubunda, amniyon sıvısının lokal uygulanması sonrasında herhangi bir immünolojik reaksiyonla karşılaşılmadı. Tüm gruplar postoperatif sekizinci haftada değerlendirmeye alındı. Ratların ameliyat sonrası takiplerinde lumbar bölgelerinde greft konulan sahalarda elle muayene ile ikinci ve üçüncü haftalarda füzyon değerlendirildi.

4.1.Radyolojik Değerlendirme

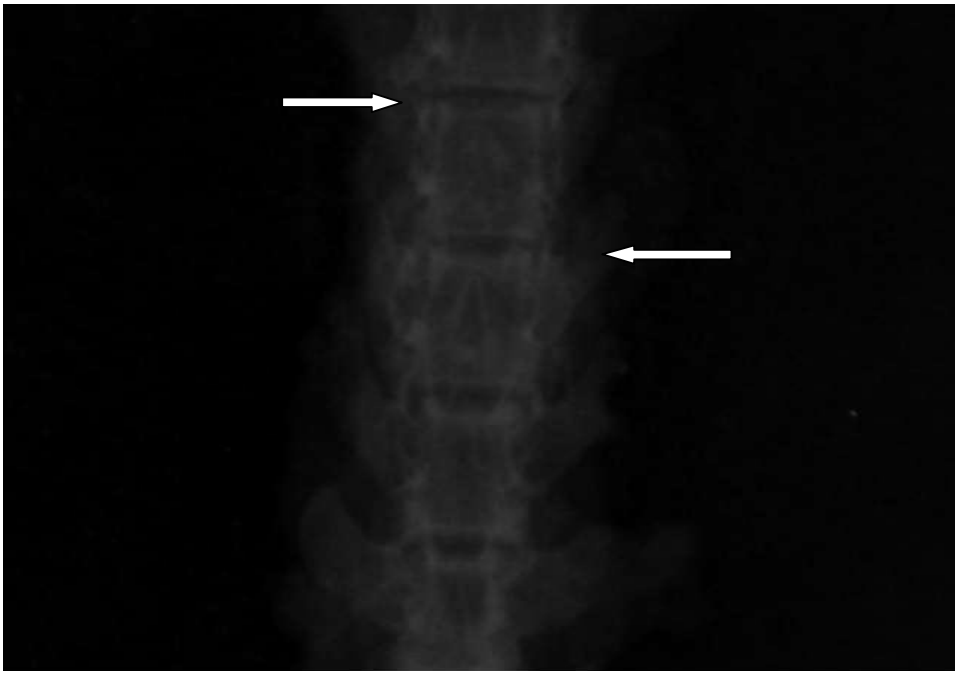
Tüm gruplarda post operatif sekizinci haftada sakrifikasyon sonrasında radyolojik görüntüler alındı.

Lenke radyolojik değerlendirme skalasına göre Otogreft grubunda O-1,O-3,O-4,O-5,O-9,O-11 'de bilateral küçük solid olmayan füzyon alanları gözlendi.O-2,O-6,O-7,O-8,O-10 'da bilateral greft resorbsiyonu ve kaynamama gözlendi.O-12 'de bilateral büyük unilateral küçük füzyon alanları gözlendi (Resim 9).



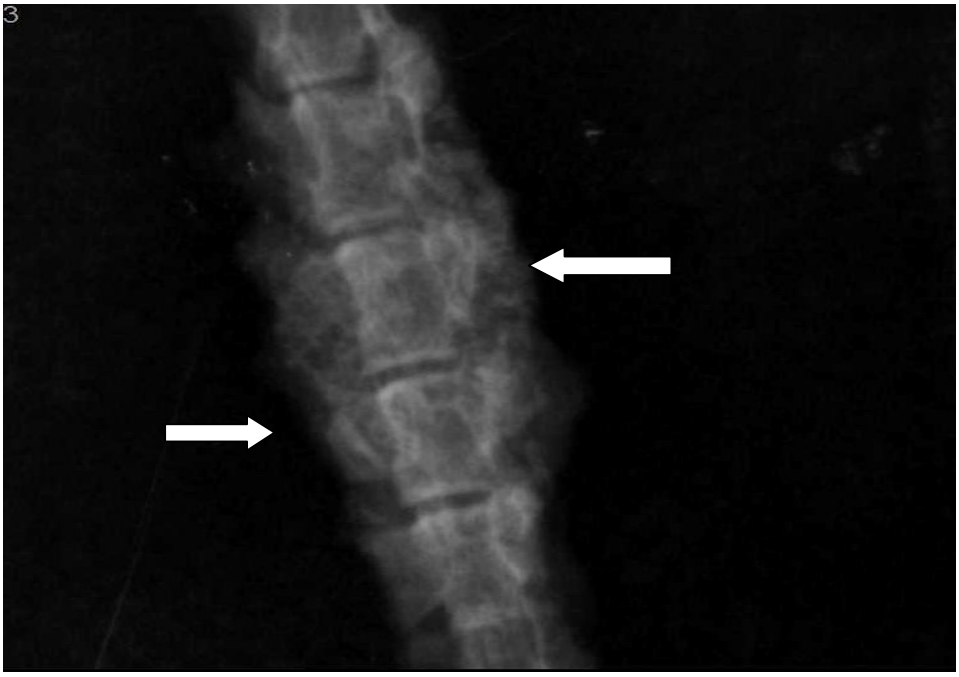
Resim 9. Sekizinci haftada otogreft grubu ratın A-P röntgenogramı. (Beyaz oklar füzyonu göstermektedir.)

Otogreft+insan amniyon sıvısı grubunda OA-7 ‘da bilateral greft resorbsiyonu ve kaynamama gözlendi.OA-3, OA-4, OA-10‘da bilateral küçük solid olmayan füzyon alanları gözlendi. OA-1, OA-2, OA-5, OA-6, OA-8, OA-11 ‘de unilateral büyük-kontrolateral küçük solid füzyon alanları gözlendi. OA-12 ‘de bilateral büyük solid füzyon alanları gözlendi(Resim 10).



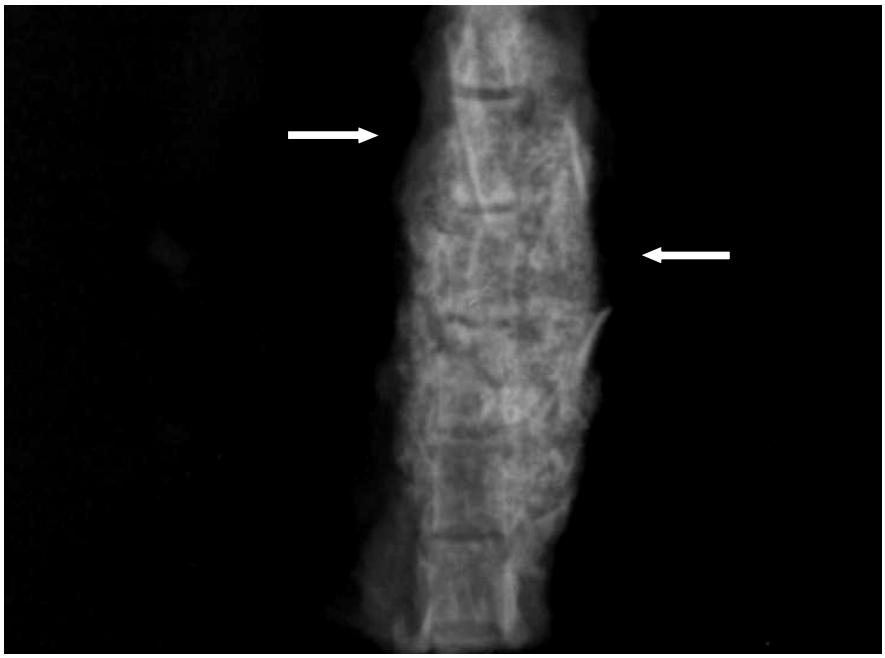
Resim 10. Sekizinci haftada otogreft+amniyon sıvısı grubunda ratın A-P röntgenogramı. (Beyaz oklar füzyonu göstermektedir.)

Allogreft grubunda A-4, A-6, A-7, A-8, A-10 'da unilateral büyük- kontrolateral küçük solid füzyon alanları görüldü. A-1, A-2, A-3, A-4, A-5, A-10 'da bilateral büyük solid füzyon alanları görüldü(Resim 11).



Resim 11. Sekizinci .haftada Allogreft grubunda ratın lumbar A-P röntgenogramı. (Beyaz oklar füzyonu göstermektedir.)

Allogreft+İnsan amniyon sıvısı grubunda AA-12 ‘de unilateral büyük- kontrolateral küçük solid füzyon alanları görüldü. AA-1, AA-2, AA-3, AA-4, AA-5, AA-6, AA-7, AA-8, AA-9, AA-10, AA-11 ‘de bilateral büyük solid füzyon alanları görüldü(Resim 12,13).

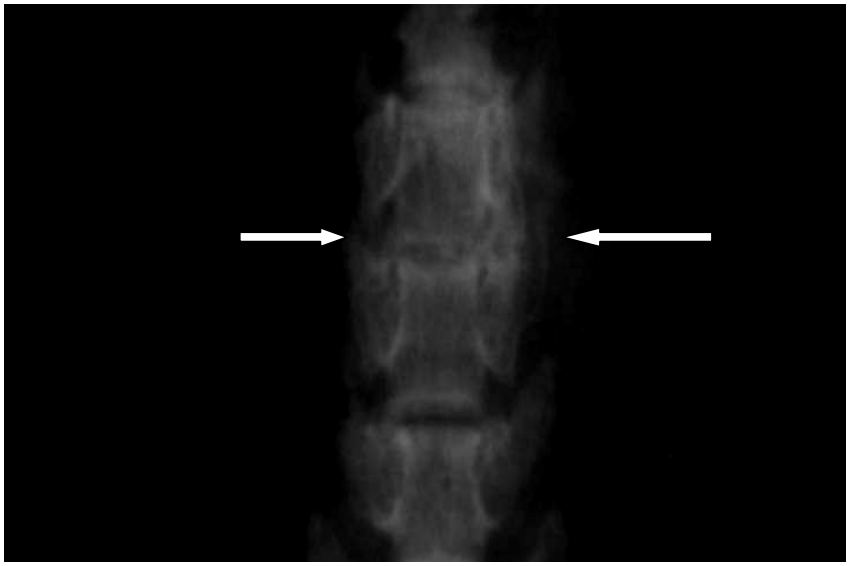


Resim 12. Sekizinci haftada Alogreft+amniyon sıvısı grubunda ratın lumbar A-P röntgenogramı. (Beyaz oklar füzyonu göstermektedir.)



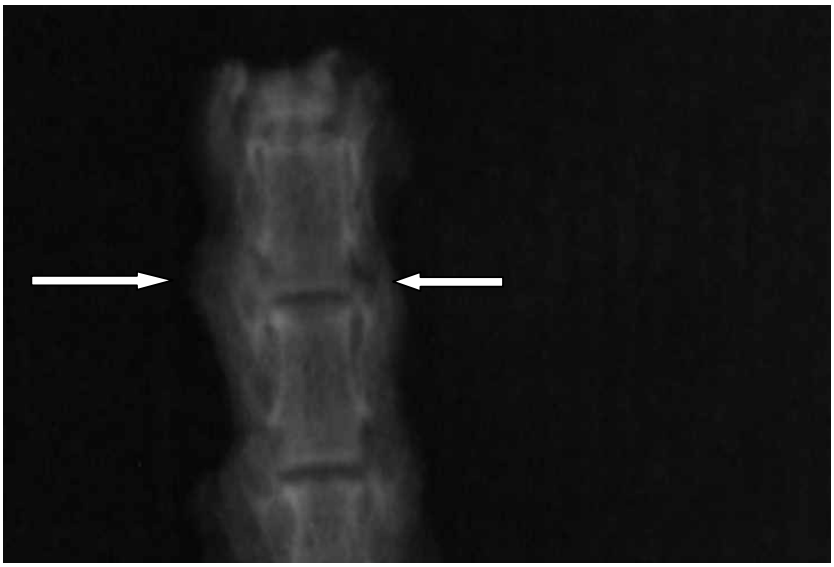
Resim 13. Sekizinci haftada Allogreft+amniyon sıvısı grubunda ratın lumbar yan röntgenogramı. (Beyaz oklar füzyonu göstermektedir.)

DKM grubunda D-2, D-3 ‘de bilateral greft rezorbsiyonu veya bilateral psödoartrozis görüldü. D-4, D-5, D-7, D-8, D-12 ‘de bilateral küçük solid olmayan füzyon alanları görüldü. D-6, D-9, D-10 ‘da unilateral büyük- kontrolateral küçük solid füzyon alanları görüldü. D -11 de bilateral büyük solid füzyon alanları görüldü(Resim14).



Resim 14. Sekizinci haftada DKM grubunda ratın A-P röntgenogramı. (Beyaz oklar füzyonu göstermektedir.)

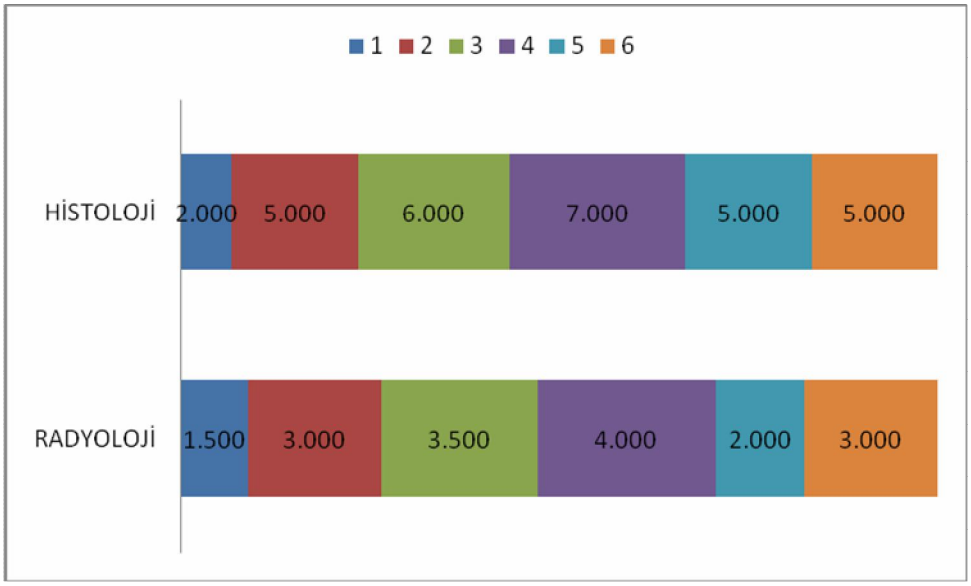
DKM + İnsan amniyon sıvısı grubunda DA-1, DA-2, DA-3, DA4, DA-7, DA-8, DA-9, DA-10 ‘da unilateral büyük- kontrolateral küçük solid füzyon alanları görüldü. DA-5, DA-6 ‘da bilateral büyük solid füzyon alanları görüldü(Resim 15).



Resim 15. Sekizinci haftada DKM+Amniyon sıvısı grubunda ratın lumbar A-P röntgenogramı. (Beyaz oklar füzyonu göstermektedir.)

Lenke skalası baz alınarak oluşturulan radyolojik veriler değerlendirildiğinde; altı grup arasındaki fark Kruskal Wallis varyans testi ile analiz edildi ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu(Tablo 3). ($p<0.05$)

Tablo 3. Sekizinci haftanın sonunda grupların radyolojik ve histolojik skalalarına göre medyan değerlerlerinin grafikle analizi



1. Otogreft
2. Otogreft+Amniyon sıvısı
3. Allogreft
4. Allogreft+Amniyon sıvısı
5. DKM
6. DKM+Amniyon sıvısı

Lenke skalası açısından hangi grubun farklı olduğuna Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanılarak bakıldığında ise O grubu ile OA grubu, O grubu ile A grubu , O grubu ile AA grubu arasındaki fark ve Ogrubu ile DA grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.0083$). O grubu ile D grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.0083$). OA grubu ile AA grubu, OA grubu ile O grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.0083$). OAgrubu ile A grubu, OA grubu ile D grubu, OA grubu ile DA grubu arasında istatistiksel olarak

anlamlı fark bulunmadı ($p>0.0083$). A grubu ile O ve D grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.0083$). A grubu ile OA, AA, DA grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.0083$). AA grubu ile O, OA, D, DA grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.0083$). AA grubu ile A grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.0083$). D grubu ile A, AA, DA grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.0083$). D grubu ile O, OA grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.0083$). DA grubu ile O,

AA, D grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.0083$). DA grubu ile OA, A grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.0083$) (tablo 4).

Tablo 4. Sekizinci haftanın sonunda grupların radyolojik ve histolojik değerlendirmelerinin sonuçları ve birbiri arasındaki farklılıklarının istatistiksel dağılımı

	GRUPLAR	n	RADYOLOJİ Median (M i n- Max)	HİSTOLOJİ Median (M i n- Max)
1	OTOGREFT	12	1,5(1-2) *[2,3,4,6]	2.0(1-3) *[2,3,4,5,6]
2	OTOGREFT+AMNİYON SIVISI	12	3.0(1-4) *[1,4]	5.0(4-5) *[1,3,4]
3	ALLOGREFT	10	3,5(3-4) *[1,5]	6.0(5-6) *[1,2,4]
4	ALLOGREFT+AMNİYON SIVISI	12	4.0(3-4) *[1,2,5,6]	7.0(6-7) *[1,2,3,5,6,]
5	DKM	12	2.0(1-4) *[3,4,6]	5.0(4-6) *[1,4]
6	DKM+AMNİYON SIVISI	10	3.0(3-4) *[1,4,5]	5.0(3-6) *[1,4]

1 Otogreft

2 Otogreft +Amniyon sıvısı

3 Allogreft

4 Allogreft+Amniyon sıvısı

5 DKM

6 DKM+Amniyon sıvısı

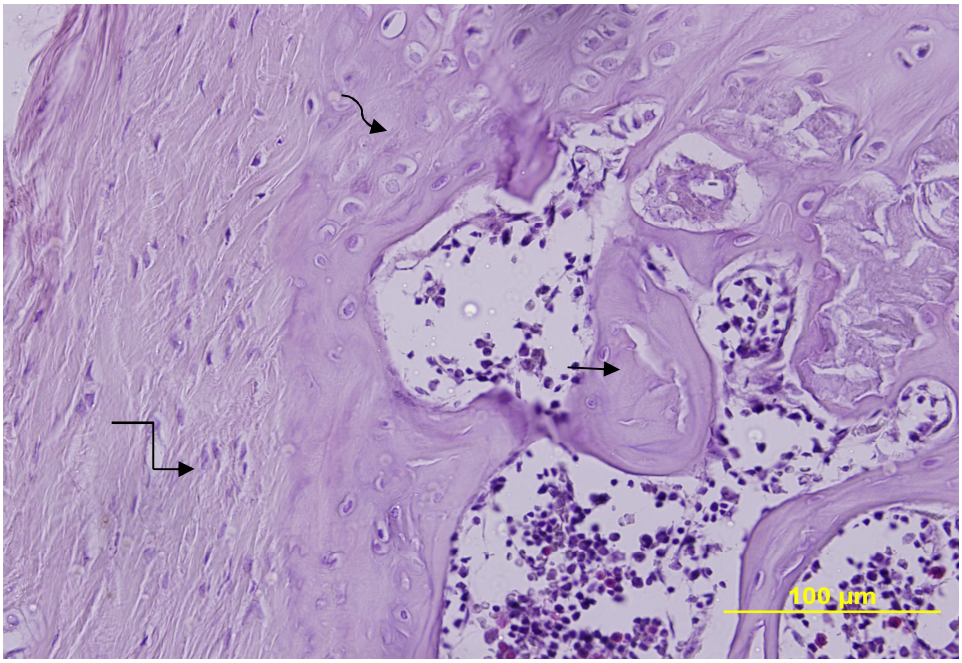
*: İstatistiksel olarak anlamlı olan grubu gösterir.

n: Gruptaki rat sayısını gösterir

4.2.Histolojik Değerlendirme

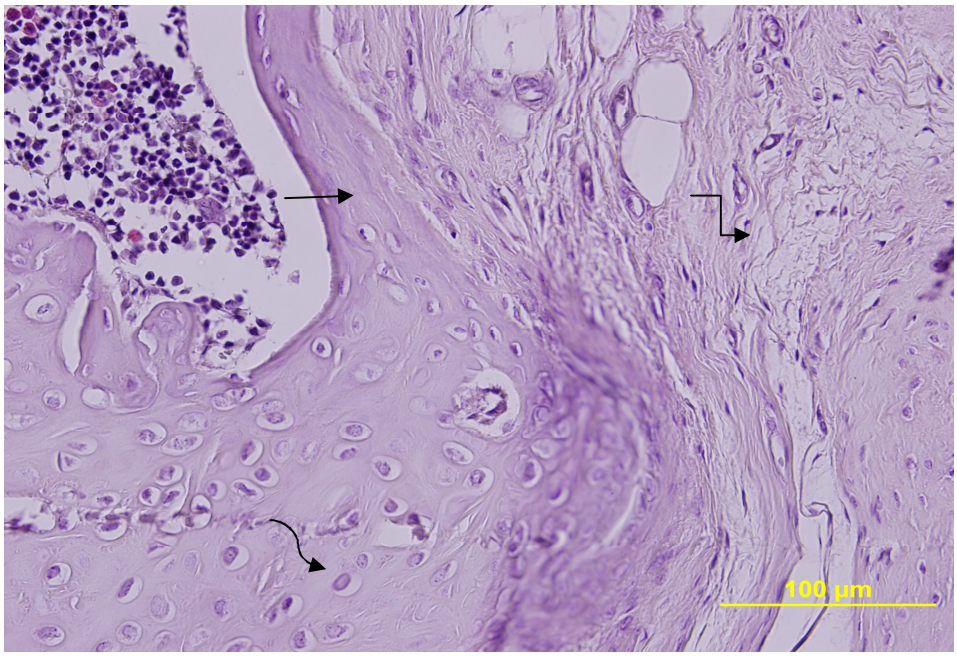
Histopatolojik incelemeler, ışık mikroskobisi eşliğinde yapılarak, her gruba ait mikro fotoğraflar çekildi.

Emery Histolojik değerlendirme skalasına göre otogreft grubunda O-1, O-6, O-7, O-8, O-10 ‘da sadece fibröz doku görüldü. O-1, O-3, O-4, O-5, O-9, O-11 ‘de fibröz doku, fibrokartilaj dokudan fazla görüldü. O-12 ‘de fibrokartilaj doku, fibröz dokudan fazla görüldü(Resim 16).



Resim 16. Sekizinci haftanın sonunda sakrifiye edilen ratlardan, otogreft grubundaki ratın x40 büyütmedeki hemotoksilen eosin boyama görüntüsü. ⟶ (Kemik doku), ↳ (Bağ doku), ↘ (Fibrokartilaj doku)

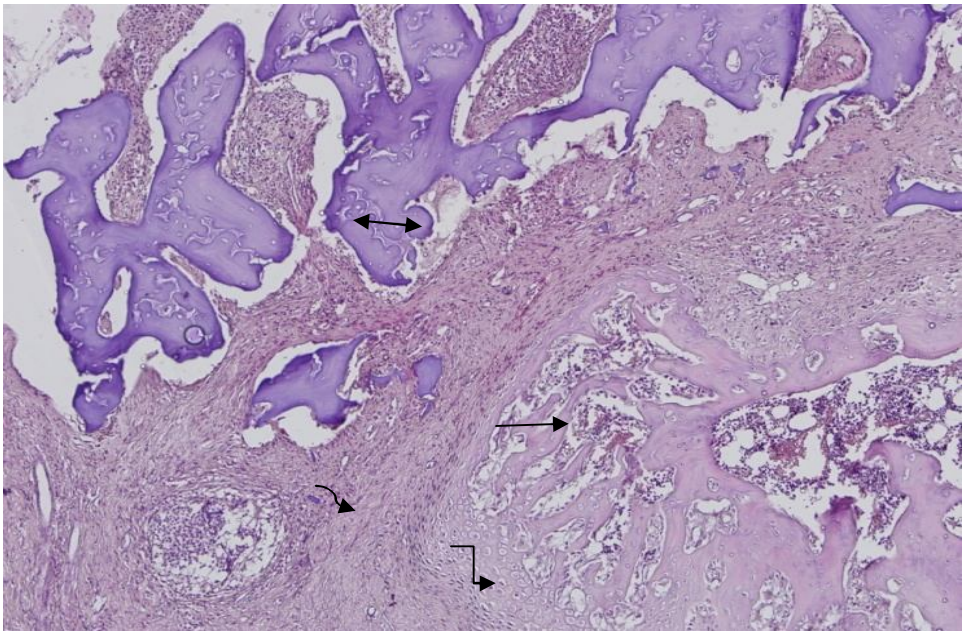
Otogreft+insan amniyon sıvısı grubunda OA-3, OA-5, OA-7, OA-10 ‘da sadece fibrokartilaj doku görüldü. OA-1, OA-2, OA-4, OA-6, OA-8, OA-9, OA-11, OA-12 ‘de fibrokartilaj doku, kemik dokudan fazla olarak görüldü(Resim 17).



Resim 17 . Sekizinci haftanın sonunda sakrifiye edilen ratlardan ,otogreft + amniyon sıvısı grubundaki ratın x40 büyütmedeki hemotoksilen eosin boyama görüntüsü.

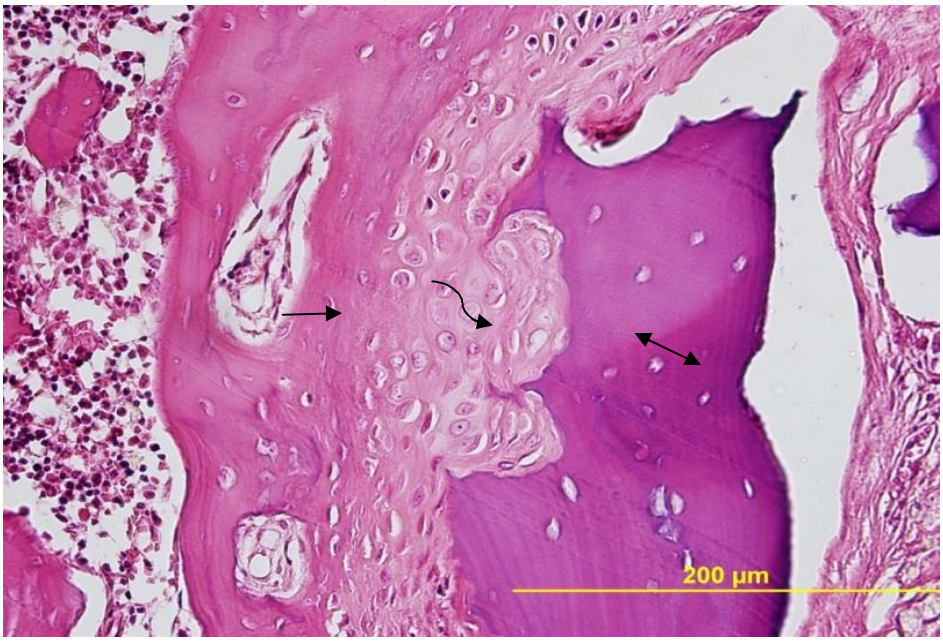
→ (Kemik doku), ↳ (Bağ doku), ↘ (Fibrokartilaj doku)

Allogreft grubunda A-3, A-5, A-7, A-10 ‘da fibrokartilaj doku, kemik dokudan fazla olarak görüldü. A-1, A-2, A-4, A-6, A-8, A-9’da kemik doku, fibrokartilaj dokudan fazla görüldü(Resim 18) .



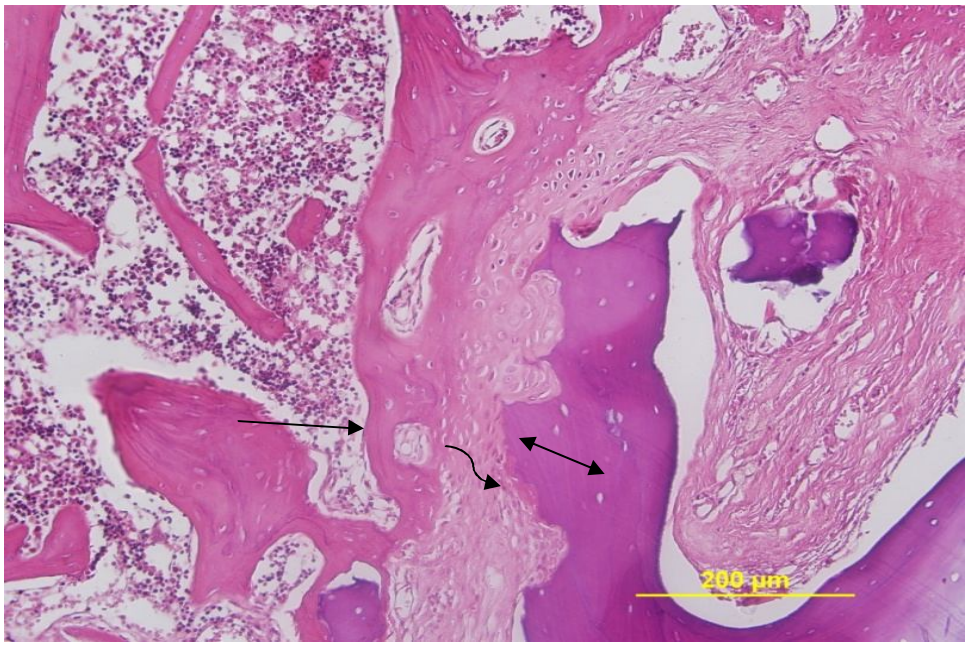
Resim 18. Sekizinci haftanın sonunda sakrifiye edilen ratlardan ,Allogreft grubundaki ratın x40 büyütmedeki hemotoksilen eosin boyama görüntüsü. ⟷ (Allogreft), ⟶ (Kemik doku), ↘ (Fibrokartilaj doku), ⮡ (Bağ doku)

Allogreft+İnsan amniyon sıvısı grubunda AA-1, AA-2, AA-5, AA-12’de kemik doku, fibrokartilaj dokudan fazla görüldü. AA-3, AA-4, AA-6, AA-7, AA-8, AA-9, AA-10, AA-11’de sadece kemik doku görüldü(Resim 19,20).



Resim 19. Sekizinci haftanın sonunda sakrifiye edilen ratlardan, Allogreft + amniyon sıvısı grubundaki ratın x40 büyütmedeki hemotoksilen eosin boyama görüntüsü.

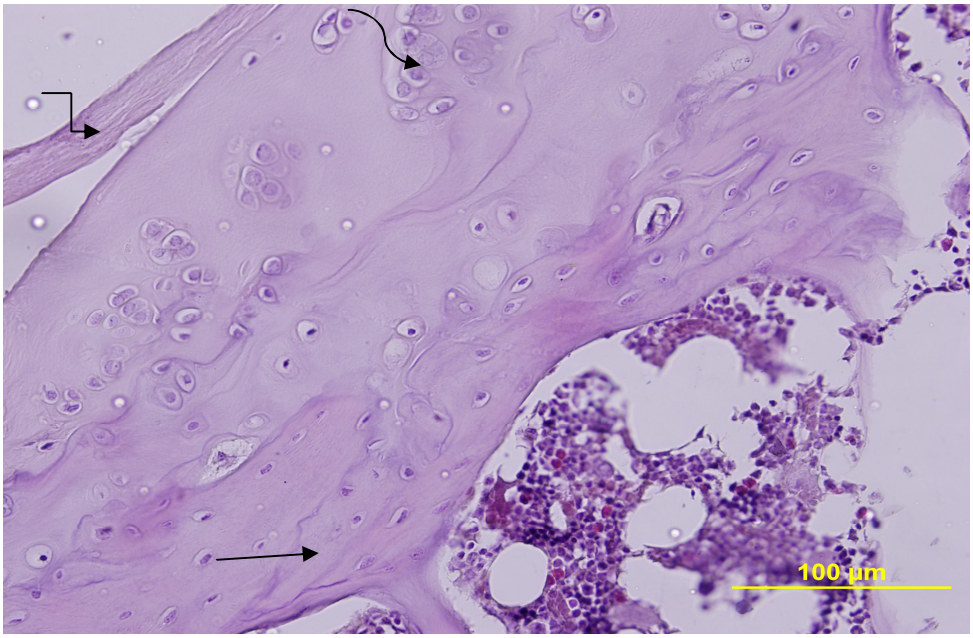
↘ (Allogreft), ↘ (Fibrokartilaj doku), → (Kemik doku)



Resim 20. Sekizinci haftanın sonunda sakrifiye edilen ratlardan, Allogreft +amniyon sıvısı grubundaki ratın x40 büyütmedeki hemotoksilen eosin boyama görüntüsü.

↘ (Allogreft), ↘ (Fibrokartilaj doku). → (Kemik doku)

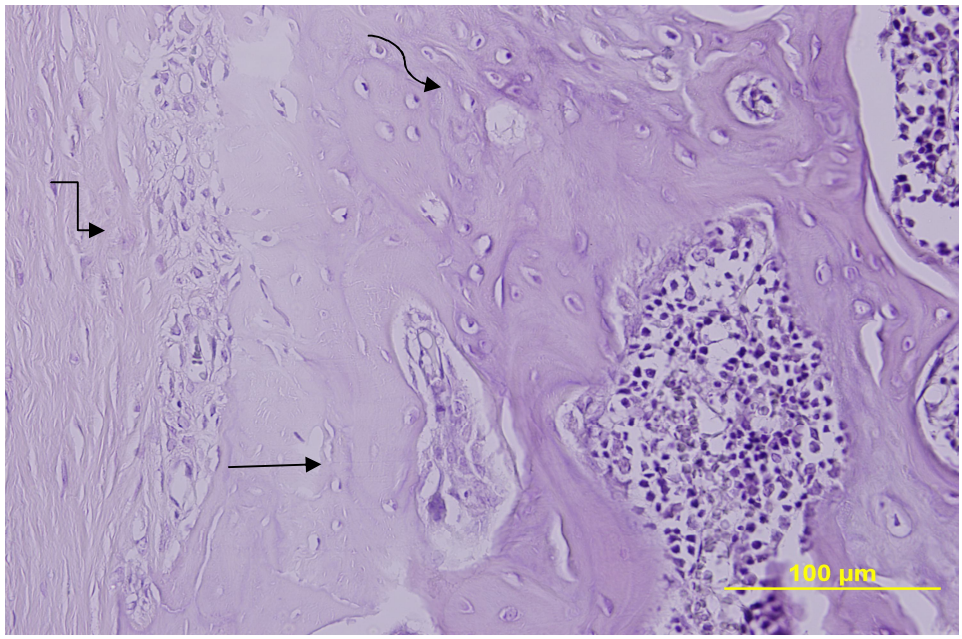
DKM grubunda D-10'da sadece fibrokartilaj doku görüldü. D-1, D-3, D-4, D-5, D-6, D-7, D-8, D-9, D-11, D-12'de fibrokartilaj doku, kemik dokudan fazla olarak görüldü. D-2'de kemik doku, fibrokartilaj dokudan fazla olarak görüldü(Resim 21).



Resim 21. Sekizinci haftanın sonunda sakrifiye edilen ratlardan ,DKM grubundaki ratın x40 büyütmedeki hemotoksilen eosin boyama görüntüsü.

→ (Kemik doku) ⤷ (Fibrokartilaj doku), ⤷ (Bağ doku)

DKM+İnsan amniyon sıvısı grubunda DA-7'de fibrokartilaj doku, fibröz dokudan fazla olarak görüldü. DA-2, DA-4, DA-6, DA-9, DA-10'da fibrokartilaj doku, kemik dokudan fazla görüldü. DA-1, DA-3, DA-5, DA-8'da kemik doku, fibrokartilaj dokudan fazla görüldü(Resim 22).



Resim 22. Sekizinci haftanın sonunda sakrifiye edilen ratlardan, DKM +amniyon sıvısı grubundaki ratın x40 büyütmedeki hemotoksilen eosin boyama görüntüsü.

(Kemik doku), (Fibro kartilaj doku) (Bağ doku)

Emery skalası baz alınarak oluşturulan histolojik verilerin değerlendirilmesinde; altı grup arasındaki fark Kruskal Wallis varyans testi kullanılarak analiz edildi ve gruplar arasındaki fark istatiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 3) .($p<0.05$).

Emery skalası açısından hangi grubun farklı olduğuna Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanılarak bakıldığında ise O grubu ile OA, A, AA, D, DA grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.0083$). OA grubu ile O, A, AA grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.0083$). OA grubu ile D, DA grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.0083$). A grubu ile O, OA, AA grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.0083$). A grubu ile D, DA grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.0083$). AA grubu ile O, OA, A, D, DA grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.0083$). D grubu ile O, AA grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.0083$). D grubu ile OA, A, DA grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.0083$). DA grubu ile O, AA grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.0083$). DA grubu ile OA, A,D grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.0083$) (tablo 4).

5.TARTIŞMA

Posterior füzyon; vertebra kırıkları, spondilolistezis, vertebral instabilite gibi durumlarda sıklıkla uygulanmaktadır. Bu uygulamalarda kullanılacak greft türleri konusunda tartışmalar mevcuttur. Günümüzde travma cerrahisi, tümör cerrahisi, revizyon artroplastisi ve vertebra cerrahisinden dolayı kemik greftlerine ihtiyaç katlanarak artmaktadır. Greft materyalleri arasında otogreftler halen en popüler seçenek olsa da, miktar olarak sınırlı olmaları ve greft alınan yerdeki morbidite oranları dezavantajlarıdır. Bununla birlikte otogreft olarak kullanılabilecek kemik miktarı sınırlıdır (66,67).

Posterolateral füzyon lomber vertebralarda en sık uygulanan artrodez tipidir. Füzyonda en sık karşılaşılan komplikasyon, kaynamama olup (3), en sık lumbal vertebralarda görülmektedir (60). Spinal kolonun bölgeleri açısından bakıldığında ise; tensil kuvvetlere daha fazla maruz kalması nedeniyle arka kolonda, daha sık görülür (10) .

Kaynamama sorunlarını en aza indirmek için greft uygulamaları yanında birçok ilave yöntem de kullanılmıştır. Lomber spinal füzyonun sonuçlarında bir gelişme sağlayabilmek için transpedinküler internal fiksasyon yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. İnternal fiksasyon endikasyonları ve klinik sonuçları tartışılmaya devam edilmesine rağmen, bu tür enstrümanların kullanımının artrodezin başarısını artırdığı da bir gerçektir (68-70). Posterolateral spinal füzyonun başarısı veya başarısızlığını sadece kullanılan greft materyalinin türüne bağlamamak gerekmektedir. Şimdiye kadar az araştırılmış olmasına rağmen füzyon sağlamada en kritik ve önemli komponent ise füzyon yatağının hazırlanma tekniği, uygun dekortikasyon ve kemik greft materyalinin ne şekilde kullanılacağıdır. İnflamatuar ve osteojenik hücrelerin ortamda bulunması,

sağlıklı bir kan akımının olması başarılı bir spinal artrodezin temel noktalarıdır. Füzyon sahasında canlı kalabilen birkaç tane transplante otolog hücre, osteojenik hücrelerin kaynağını oluşturabilmektedir (88). Dolayısıyla uygun dekortikasyon ve alıcı kemiğin hazırlanması yani yüzey alanının genişletilmesi ve bunu yaparken mekanik ve hücresel zararın minimum seviyede olması önemli noktalardır. Bazı çalışmalarda otogreftin morselizasyonunun, kemik greftinin yüzey alanını artırma da osteoindüktif ve osteojenik faktörlerin, greftin içine girebilme imkanını sağlama yoluyla, osteogenezisin daha hızlı olmasını sağladığı belirtilmektedir (89). Taze otojen spongiyöz greftler trabeküler yapıya sahiplerdir. Kemik iliği ve primitif osteojenik multipotansiyel hücreler içerdikleri için hızlı revaskülarizasyon ve kaynama yeteneği vardır. Bu nedenle tercih edilmektedir Spongiyöz otojen greftlerde osteoblastik aktivitenin, osteoklastik aktiviteden daha erken başlaması ile kemikleşme zamanında ve tam olur. Kortikal greftlerde ise osteoklastik aktivite daha ön planda olup, revaskülarizasyon ve kemikleşme tam zamanında olmaz. Bu greftlerde yıllar sonra avasküler ve sekestre kemik dokusu greft bölgesinde hala bulunur. Spongiyöz greftler osteogenezisin ön planda olduğu durumlarda kullanılırken, kortikal greftler daha çok ossifikasyon istenilen durumlarda kullanılmalıdır (89).

Spinal kolonun bölgesel mekaniğinin, iyileşme potansiyelinde anlamlı bir etkisinin olduğu görülmektedir. Servikal ve torakal posterior füzyonla, lumbar posterior füzyon karşılaştırıldığında servikal ve torakal seviyelerde kaynamanın daha iyi olduğu gözlemlenmiştir (90).

Bu çalışmada ratlar, laboratuar ortamında kolay elde edilebilmeleri, spesifik ve pahalı olmayan bakım ihtiyaçlarından dolayı tercih edilmiştir. Brett Peterson ve arkadaşlarının ticari DKM'in füzyon oranlarını araştırdığı çalışmada ratlar kullanılmıştır (19). Raj D ve ark. kemik morfojenik proteinle beraber kemik iliği ve plateletten zengin plazmanın posterior füzyona etkisini araştırdıkları çalışmada ratlar kullanılmıştır (86) . David A. ve ark. putty grefti ve OP-1 putty grefti karşılaştırdığı çalışmada yine rat posterior füzyon modeli kullanılmıştır (87) .Biz de bu otörlerin verdikleri bilgiler ışığında çalışmamızı ratlarla yaptık.

Dünyada spinal cerrahilerde füzyon uygulamalarında posterolateral uygulamalar , enstrümentasyonla birlikte artmıştır. George J. Martin ve ark. greft alternatiflerini araştırdığı çalışmada posterolateral füzyon uygulanmıştır (84). Raj D ve ark. yaptığı

çalışmada (86) , David A ve ark. putty grefti ve OP-1 putty grefti karşılaştırdığı çalışmada posterolateral lomber füzyon tercih edilmiştir (87). Deneysel çalışmalarda posterolateral füzyon daha sık tercih edildiğinden çalışmamızda posterolateral lomber füzyonu tercih ettik.

Literatürde yapılan deneysel çalışmalarda posterolateral füzyonu değerlendirmek için 6-9 hafta arasında postoperatif dönem beklenmiştir. George J. Martin ve ark. greft alternatiflerini araştırdığı çalışmada posterolateral füzyon uygulamıştır. Altı hafta sonra füzyonu değerlendirmişlerdir (84). Albert Juang Ming Yee ark. yaptığı çalışmada füzyona dokuzuncu haftanın sonunda bakılmıştır (85).Bizde bu otörlerin tecrübelerine dayanarak ameliyat sonrası 8. haftada füzyonu değerlendirdirmek için hayvanları sakrifiye ettik.

Otolog kansellöz kemik greftleri halen spinal füzyon, kemik kayıplarının doldurulması ve kırık tedavisinde kemik iyileşmesini sağlayan en etkili greft materyali olarak bilinir. Burwell 196O'lı yıllarda yaptıgı çalışmalarda, otogreft uygulaması sonrası gelişen yeni kemik dokusunda primitif osteojenik hücrelerin nakil sonrası hayatta kalarak ileri dönemde osteoblastlara dönüştüğünü göstermiştir(28). En sık greft alınan bölge olan iliak kanata ait morbiditelerle sık olarak karsılaşılmaktadır. Majör komplikasyonlar %8,6, minör komplikasyonlar ise %20,6 olarak rapor edilmiştir. Greftin sınırlı miktarda alınabilmesi kullanım açısından problem yaratır(25,30).

Finkemeier CG ve ark. greft materyalleri ile ilgili derlemesinde, otogreftlerin mükemmel kaynama oranından ve düşük infeksiyon geçiş oranınından bir avantaj olarak bahsedilmiştir (29). Fakat düşük miktarlarda elde edilebilirliği ve donör saha morbiditesini dezavantaj olarak belirtmiştir. Biz de yaptığımız çalışmamızda ratlardan düşük miktarda otogreft elde edebildik.

Allogreftler, otogreftlerle beraber veya otogreftlerin yerine en çok kullanılan greft türleridir. Anterior servikal vertebralar allogreftlerin otogreftler yerine sıklıkla kullanıldığı alanlardır. Kansellöz allogreft sonuçları değişkendir. Bu tip greftin kullanımı otolog kemik grefti için kemik stoğunun kısıtlı olduğu hastalar ile sınırlandırılmalıdır. Bridwell ve arkadaşları otojen kemik alımının mümkün olmadığı paralitik hastalarda allogreftleri uygun bulmuşlardır (101). Çocuklarda allogreft kullanılarak başarılı posterior füzyon olduğunu gösteren çeşitli yayınlar bulunmaktadır (101). Yüksek orandaki hastada lomber omurgada allogreftlerde çökme saptansa da,

anterior olarak otolog kemik greftleri ile desteklenmiş yapısal allogreftlerle kabul edilir füzyon oranı sağlanır. Brown ve ark (91) taze donmuş allogreftle tedavi ettikleri 29 hastayı otogreft grubu ile karşılaştırdıklarında, füzyon ve greft rezorbsiyonu açısından farklılık bulamamışlardır. Bütün bu araştırmalar tek seviyeli füzyonlar için geçerliyken, bu yazarlar birden fazla seviyeli, allogreftle yapılan füzyonlarda daha yüksek oranlarda rezorbsiyon olduğunu vurgulamaktadır. Young ve Rossenwasser fibular allogreft kullanarak füzyon yapmışlar ve ameliyat sonrası füzyondaki başarı açısından iliak kanat allogrefti ile arasında farklılık bulamamışlardır (92). Zhang ve arkadaşları 121 hasta üzerinde retrospektif çalışmada, çok seviyeli servikal spinal füzyonları araştırmışlar, otogreftle yapılan füzyonlarda %85, allogreftle yapılan füzyonlarda %50 başarı gözlemlemişlerdir (93).

Bazı yazarlar yetişkinlerde posterior lomber füzyonda allogreftlerin yalnız veya otogreftlerle beraber kullanımını işaret etmişlerdir. Jorgensen ve arkadaşları (81) prospektif bir klinik çalışmada allogreftlerle otogreftlerin karıştırılarak kullanıldığı olgularla, otogreftlerin yalnız kullanıldığı olguları karşılaştırmışlar ve birinci gruptaki radyolojik füzyonu daha düşük bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda da allogreft grubunun yeterli kemik stoku sağlayabilmesinden dolayı otogreft grubuna göre füzyonu daha fazla artırdığı istatistiksel olarak gözlenmiştir. Bu veriler, allogreftlerin yeterli kemik stoku sağlamasıyla vertebral füzyonu arttırmada etkili olduğu yönünde yorumlanmıştır.

DKM osteoindüktif potansiyeli olan ve kolayca elde edilebilen bir greft türüdür. DKM'in iyi bir greft alternatifi olduğu birçok uygulamada gösterilmiştir (25,27). Ancak vertebral füzyonla ilgili literatürde yeterli çalışma bulunmamaktadır. Birçok deneysel hayvan modeli, DKM'in osteoindüktif kapasitesini araştırmak için veya otogreftlerin biyolojik aktivitesini artırabilmek için geliştirilmiştir (98,99). Morone ve Boden düşük otogreft hacminin DKM jeli ile hazırlanan karışımınının otogreft ile elde edilen füzyona benzer sonuçlar ortaya çıkardığını göstermişlerdir (100). DKM etkisini araştırmak amacı ile birçok deneysel çalışma modeli yayınlanmıştır. Urist 'in yaklaşık 40 yıl önce yaptığı çalışmada (44) DKM'in osteoindüktif kapasitesi ortaya konmuştur. Deneysel ve sınırlı sayıdaki klinik çalışmalarda DKM kemik oluşumunu artırdığı gösterilmiştir. DKM, kemik matriks proteinlerin bir kompozit materyalidir. Mineral salınımı esnasında kemik matriks proteinler salınır. Değişik hayvan modellerinde, bazı DKM preparatlarının osteogenezi artırdığı gösterilmiştir (74-77). Brett Peterson ve ark. ticari DKM türevlerinin otogrefte göre kaynama potansiyelini araştırdığı deneysel rat

çalışmasında da DKM ile tatminkar füzyon oranlarından bahsedilmiştir (19). Sasord ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada posterolateral lumbar füzyonda enstrümantasyon sonrası lokal kemik grefti (spinöz vertebral çıkıntılar) ve DKM kullanmışlar, hastaları yaşa, cinsiyete ve uygulanan cerahi prosedüre göre sınıflandırarak füzyon araştırmışlar. Üçüncü, 6. 9. 12. ve 24. aylarda çekilen grafilerde farklılık saptayamamışlardır. Sonuçta otörlerin vardığı kanaat ise, füzyonun başarısında enstrümentasyon seçiminin direkt etkisi olduğu ve 24 aylık mineralizasyonda belirleyici olduğu yönündedir (97). Bu çalışmada osteoindüktif etkisi olan DKM ve yine değişik tip osteoindüktif proteinler içeren amniyon sıvısını posterolateral füzyonu artırıcı etkisini araştırmak maksadıyla birlikte ve ayrı olarak kullandık. Bizim çalışmamızda DKM'in Emery histolojik çalışma skalasına göre skorları, otogreft grubunun verilerine göre istatistiksel olarak anlamlıydı. Birçok büyüme faktörleri içeren amniyon sıvısının DKM ile kombinasyonunun Lenke radyolojik skala skorları,sadece DKM verilen gruba göre istatistiksel olarak anlamlıydı. Bu veriler, posterior füzyonda DKM'in vertebral füzyonu arttırmada daha etkili olduğunu göstermektedir.

Donör saha morbiditesini en aza indirmek, kaynamama oranını azaltmak için değişik greft doku tipleri ve kemik matriks proteinler gibi osteoindüktif proteinler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Amniyon sıvısının içerisinde osteoindüktif potansiyeli artırıcı proteinler mevcuttur. Amniyon sıvısıyla ilgili yapılan çalışmalarda; amniyon sıvısının hücre farklılaşmasında, migrasyonunda ve değişik hücre tiplerinin invazyonunda olumlu etkilerinin olduğu belirtilmiştir (11). Özgenel ve arkadaşları, amniyon sıvısının perikondral greftlerde yeni kıkırdak oluşumunu hızlandırdığını ve bunun da amniyon sıvısı içeriğindeki zengin HA ve büyüme faktörlerinden kaynaklanabileceğini öne sürmüşlerdir (11). Özgenel ve arkadaşları; perikondriyal fleplerde kıkırdak dokusunun oluşmasında amniyon sıvısının etkisini inceledikleri başka bir çalışmada; 8. hafta sonunda, skar dokusu ve yeni kıkırdak oluşumunda, amniyon sıvısının içeriğindeki büyüme faktörleri ve ekstrasellüler matriks öncüllerinden dolayı olumlu etkisinin olduğunu bildirdiler (71). Bu sonuçlar bizim ratlarda uyguladığımız posterolateral füzyonu değişik allogreft türleri ile incelediğimiz; ve amniyon sıvısının osteoindüktif etkisini incelediğimiz çalışmamızdaki sonuçlara benzerdir. Amniyon sıvısının, osteoblastik kemik yapımını indükleyici etkisini inceleyen çalışmalarda; Karaçal ve arkadaşları, tavşanlardaki kemik defektlerine uyguladıkları amniyon sıvısı ile, 6. haftanın sonunda histopatolojik olarak kemik oluşumunun daha iyi olduğunu

bildirmişlerdir (15). Aslan ve arkadaşları; tavşan tibialarındaki kemik defektleri üzerine yaptıkları araştırmalarda, HA'in greftle beraber uygulandığı grupta, sonuçların histolojik açıdan daha iyi olduğunu bulmuşlardır. HA'in, kemik defektleri üzerinde olumlu etkisi olduğunu rapor etmişlerdir (73). 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 bulmuşlardır (72). Amniyon sıvısı birçok büyüme faktörü (FGF, EGF, IGF-I, IGF-II), mukopolisakkarit (HA, HASA), hücredışı büyük moleküller (fibronektin, laminin) içermektedir. Bir polisakkarit olan HA hücre farklılaşmasında, ilerlemesinde ve invazyonda arttırıcı yönde etki etmektedir. Bundan dolayı kemik, sinir ve tendon iyileşmesinde mezenşimal bir sinyal sağlar. HA, HASA yeni kemik formasyonunun oluşmasını arttırdığı rapor edilmiştir (15,94). Bizim çalışmamızda da insan amniyon sıvısı vertebral füzyonda greftlerle birlikte deneysel rat modelinde uygulanmıştır. Otogreft +amniyon sıvısı grubunda elde edilen histolojik ve radyolojik füzyon skorları , otogreft grubunda elde edilen füzyon skorlarına göre istatistksel olarak anlamlı idi. Allogreft+amniyon grubunda elde edilen histolojik ve radyolojik füzyon skorları allogreft grubunun füzyon skorlarına göre istatistiksel olarak anlamlı idi. DKM+amniyon sıvısı grubunda elde edilen histolojik ve radyolojik füzyon skorları demineralize kemil matriks grubunun füzyon skorlarına göre anlamlı idi. Bu veriler; içerdiği birçok molekül ve büyüme faktörüyle birlikte amniyon sıvısının vertebral füzyonu arttırmada daha etkili olduğunu göstermektedir.

Amniyon sıvısı içeriğindeki hiyaluronik asidin 16-20. gestasyonel periyottaki ortalama konsantrasyonu 20µg/ml'dir (63). Bu konsantrasyon, 30. haftada ortalama 1µg/ml'ye düşer ve son haftaya kadar sabit olarak kalır (63). Benzer şekilde; amniyon sıvısındaki diğer büyüme faktörlerinin konsantrasyonlarının da gestasyonel yaşla değiştiği bilinmektedir (13,62). 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 (95). Varner ve arkadaşları da, EGF seviyesinin gestasyonel haftaların sonlarına doğru yükseldiğini bildirdiler (96). 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 (13). Çalışmamızda, özellikle 20. gestasyonel haftasında amniyon sıvısının yüksek düzeyde HA ve HASA içermesinden dolayı, 20. gestasyonel haftada alınan amniyon sıvısını posterolateral 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 (11,63).

Bu çalışmada Allogreft grubunun ve DKM grubunun yeterli kemik stoku sağlayabilmelerinden dolayı füzyonu artırıcı etkisi dikkati çekmektedir. Yine bu çalışmada amniyon sıvısının füzyonda kullanılan greftlere osteoindüktif etkisi, histolojik ve radyolojik açıdan istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

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 (78). Dimar ve arkadaşları, füzyonda nonsteroid antiinflamatuar ilaçların etkilerini araştırdılar. 12 hafta sonunda füzyonu değerlendirdiler. Sonuçta, nonsteroid antiinflamatuar ilaçların füzyonu olumsuz etkilediğini buldular (79). Huang ve arkadaşları; füzyonda alendronatın etkilerini incelediler. 8. hafta sonunda füzyonu değerlendirdiler. Sonuçta, alendronatın füzyonu olumsuz şekilde etkilediğini bildirdiler (80).

Gözardı edilemeyecek bir diğer sorun da tedavi maliyetleridir. Allogreft türleri ve DKM kullanımı tedaviye yüklü maliyetler katmaktadır. Sosyal güvenliğin önemli bir sorun olduğu ve bunun karşılanmasının ülkelerin bütçe açıklarına önemli bir yük oluşturduğu günümüzde tedavi harcamaları kısıtlamaya götürülmeye çalışılmaktadır. Bu çalışma ile insan amniyon sıvısının; osteoindüktif materyallerin araştırmalarına ciddi yatırımların yapıldığı bu zamanda, posterolateral füzyonu artırmadaki katkısı ve çeşitli greftlere olan etkisi araştırılmıştır.

6.SONUÇLAR

Bu deneysel çalışmanın sonuçları;

1- Posterior spinal füzyonda otogreft altın standart olmasına rağmen, yeterli kemik stoku olmadığında istenen füzyon oluşmamaktadır.

2- Posterior spinal füzyonda amniyon sıvısının füzyonu artırıcı etkisi mevcuttur. Bu etki 8.haftanın sonunda DKM grubunun histolojik verileri haricinde tüm amniyon sıvısı gruplarında radyolojik ve histolojik olarak gözlenmiştir.

3- Amniyon sıvısı uygulamasıyla, stabil füzyon elde edilerek tedavi maliyetinin en aza indirilebileceğini düşünüyoruz.

4- Allogreft grubunda amniyon sıvı ile kombinasyonda histolojik ve radyolojik olarak füzyonun daha iyi olduğu gözlendi.

5- Amniyon sıvı uygulamasının füzyonu artırmasının umut verici olduğunu, ve bununla ilgili daha fazla çalışmanın gerekli olduğunu düşünüyoruz.

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 2004; 425:135-42.

2. Bridwell KH, Sedgewick TA, O'Brien MF, Lenke LG, Baldus C. The role of fusion and instrumentation in the treatment of degenerative spondylolisthesis with spinal stenosis. J Spinal Disord.1993; 6(6):461-72.

3. Karaissıvıloğlu N, Tomak Y, Andaç A, Ergün E:Posterior füzyon oluşturmada otogreft, koral greft ve ksenogreft etkinliklerinin karşılaştırılması. Acta Orthop Trau Turc 2002,36:147-54.

4. Wellington K. Hsu1 Jeffrey C. Wang2 Biologic substitutes in spinal arthrodesis Coluna/Columna. 2007;6(3):174-82.

5.James P, Lawrence MD, Frank Enis MD: Effect of daily parathyroid hormone (1-34) on lumbar fusion in a rat model. The Spine Journal 2006; 4: 385-90.

6. Hannouche D, Petite H, Sedel L:Current trends in the enhancement of fracture healing. J Bone and Joint Surg Br 2001; 83:157-64.

7. Einhorn TA: Enhancement of fracture healing. J Bone and Joint Surg Am 1995;77(6):940-56.

8. 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 1995 ;80(6):1822-31.

9. Bostrom MPG, Saleh KJ, Einhorn TA: Osteoinductive growth factors in preclinical fracture and long bone defects models. Orthop Clin North Am 1999;30;647-58.

10. Yazar T, Altun N: Dejeneratif omurga hastalıkları Türk Omurga Derneği Yayınları 2007; 2:707-36.

11. Özgenel GY, Gülaydan F, Ozcan M:Effcts of human amniotic fluid on cartilage regeneration from free perichondral grafts in rabbits. J Plast Surg Br 2004;57(5):423-8.

12. Robbins K.C:Temel Patoloji (çev. U Çevikbaş) Nobel yayınları, No:5,1992,s.51. 3

13. Merimee TJ, Grant M, Tyson JE: Insulin-like growth factors in amniotic fluid. J Clin Endocrinol Metab 1984;59(4):752-8.

14. Laurent, T. C, Fraser J. R: Hyaluronan. FASEB J 1992;6: 2397-2404.

15. Karaçal N, Koşucu P, Cobanoğlu U, Kutlu N: Effect of human amniotic fluid on bone healing. J Surg Res 2005; 129(2):283-7.

16. Sasaki T, Watanabe C: Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high-molecular hyaluronic acid. 1995;16: 9-16.

17. Sonntag VK, Marciano FF. Is fusion indicated for lumbar spinal disorders. Spine 1995; 20 (245) :138-42.

18. Alıcı E Omurga hastalıkları ve deformiteleri Dokuz Eylül Üniversitesi Yayınları, İzmir 1991, s: 230-59.

19. Brett Peterson, Peter G. Whang, Roberto Iglesias, Jeff C. Wang and Jay R. Lieberman. Osteoinductivity of Commercially Available Demineralized Bone Matrix Preparations in a Spine Fusion Model. J Bone Joınt Surg Am 2004 ; 86:2243-50.

20. Scott D. Boden, MD, Dieter Grob, MD, and Christopher Damien, PhD Ne-Osteo Bone Growth Factor for Posterolateral Lumbar Spine Fusion: Results From a Nonhuman Primate Study and a Prospective Human Clinical Pilot Study Spıne 2004; 29, 5: 504–14.

21. Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, LaurencinCT, Rosier RN: Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. J Bone Joint Surg Am 2001;83-A(Suppl 2, Pt2):98-103.

22. Szpalski M, Gunzburg R: Applications of calcium phosphatebased cancellous bone void fillers in trauma surgery. Orthopedics 2002;25(5):601-9.

23. Moore WR, Graves SE, Bain GI: Synthetic bone graft substitutes. ANZ J Surg 2001;71(6):354-61.

24. Bauer TW, Muschler GF: Bone graft materials. An overview of the basic science. Clin Orthop 2000; 371: 10-27.

25. Fleming JE Jr, Cornell CN, Muschler GF: Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering. Orthop Clin North Am 2000; 31(3):357-74.

26.Sharon Stewenson, DVH, PHD.Biology of bone grafts.Orthop Clin of North Am 1999;30:543-52.

27. Chrıstopher G. Fınkemeıer, MD Current Concepts Review Bone-Grafting and Bone-Graft Substitutes The Journal of Bone & Joınt Surgery 2002; 84-A (3): 458-64.

28. Burwell RG: Studies in the transplantation of bone. VII. Thefresh composite homograft autograft of cancellous bone. An analysis of factors leading to osteogenesis in marrow transplants and in marrow-containing bone grafts. J Bone Joint Surg Br 1964;46-B:110-40.

29. Finkemeier CG: Bone-grafting and bone-graft substitutes. J Bone Joint Surg Am 2002;84-A(3):454-64

30. Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA: Complications of iliac crest bone graft harvesting. Clin Orthop 1996; 329:300-9.

31.Dell PC, Burchardt H, Glowczewskie FP Jr. A roentgenographic, biomechanical, and histological evaluation of vascularized and non-vascularized segmental fibular canine autografts. J Bone Joınt Surg Am 1985;67: 105-12.

32. Doi K, Tominaga S, Shibata T. Bone grafts with microvascular anastomosis of vascular pedicles: an experimental study in dogs. J Bone Joınt Surg Am . 1977;59: 806-15.

33.Stevenson S: Enhancement of fracture healing with autogenous and allogenic bone grafts. Clin Orthop 1998;355 (Suppl):S:239-46.

34.Enneking WF, Burchardt H, Puhl JJ, Piotrowski G: Physical and biological aspects of repair in dog cortical-bone transplants. J Bone Joint Surg Am 1975; 57-A(2) :237-52.

35.Tang CL, Mahoney JL, McKee MD, Richards RR, Waddell JP, Louie B: Donor site morbidity following vascularized fibular grafting. Microsurgery 1998;18(6):383-6.

36.Green SA. Skeletal defects. A comparison of bone grafting and bone transport for segmental skeletal defects. Clin Orthop 1994;301:111-7.

37.Duman H, Sengezer M, Celikoz B, Turegun M, Isik S. Lower extremity salvage using a free flap associated with the Ilizarov method in patients with massive combat injuries. J Ann Plast Surg 2001; 46: 108-12.

38.Muschler GF, Boehm C, Easley K: Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. J Bone Joint Surg Am 1997;79(11):1699-709.

39.Connolly JF, Guse R, Tiedeman J, Dehne R: Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial kaynamamas. Clin Orthop 1991; 266:259-70.

40.Goldberg VM, Stevenson S.Natural history of autograft and allografts Clin Orthop 1987;225-227.

41.Bonfiglio M.Repair of bone transplant. J Bone Joint Surgery 1962;44-A:1029-38.

42.Fideler BM, Vangsness CT Jr, Moore T, Li Z, Rasheed S: virus Effects of gamma irradiation on the human immunodeficiency. A study in frozen human bone-patellar ligament- bone grafts obtained from infected cadavera. J Bone Joint Surg Am1994; 76-A(7): 1032-5.

43. Cornu O, Libouton X, Naets B, Godts B, et al: Freeze-dried irradiated bone brittleness improves compactness in an impaction bone grafting model. Acta Orthop Scand 2004;75(3):309-14.

44.Urist MR, Silverman BF, Buring K, Dubuc FL, Rosenberg JM: The bone induction principle. Clin Orthop 1967; 53: 243-83.

45. Urist MR, Dawson E: Intertransverse process fusion with the aid of chemosterilized autolyzed antigen-extracted allogenic (AAA) bone. Clin Orthop 1981; 154: 97-113.

46.Tiedeman JJ, Garvin KL, Kile TA, Connolly JF. The role of a composite, demineralized bone matrix and bone marrow in the treatment of osseous defects. Orthopedics 1995;18: 1153-8.

47Upton J, Glowacki J. Hand reconstruction with allograft demineralized bone: twenty-six implants in twelve patients .J Hand Surg(Am) 1992; 17: 704-13.

48. Whiteman D, Gropper PT, Wirtz P, Monk P. Demineralized bone powder. Clinical applications for bone defects of the hand. J Hand Surg(Am) 1993;18: 487-90.

49.Hu X, Yao L, Lu C, Wang S, Chen Y. Experimental and clinical investigations of human insoluble bone matrix gelatin. A report of 24 cases. Clin Orthop 1993;293:360-5.

50.Johnson EE, Urist MR, Finerman GA. Resistant kaynamamas and partial or complete segmental defects of long bones. Treatment with implants of a composite of a human bone morphogenetic protein (BMP) and autolyzed, antigen-extracted, allogeneic (AAA) bone. Clin Orthop 1992 ; 277:229- 37.

51. Connolly JF. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. Clin Orthop 1995;313:8-18.

52. Enneking WF, Mindel ER. Observations on massive retrieved human allografts. J Bone Joint Surg Am 1991;73 : 1123-42.

53. Bucholz RW, Carlton A, Holmes R. Interporous hydroxyapatite as a bone graft substitute in tibial plateau fractures. Clin Orthop 1989;240: 53-62.

54. Werntz JR, Lane JM, Piez C: The repair of segmental bone defects with collagen and marrow. Orthop Trans 1986; 10:334-39.

55.Johnson KD, Frierson KE, Keller TS, Cook C, et al: Porous ceramics as bone graft substitutes in long bone defects: A biomechanical, histological and radiographic analysis . J Orthop Res 1996;14(3):351-69.

56. Boden SD, Zdeblick TA, Sandhu HS, Heim SE: The use of rhBMP-2 in interbody fusion cages. Definitive evidence of osteoinduction in humans: a preliminary report. Spine 2000;25(3):376-81.

57. Heckman JD, Ehler W, Brooks BP, Aufdemorte TB, Lohmann CH, et al: Bone morphogenetic protein but not transforming growth factor-beta enhances bone formation in canine diaphyseal kaynamamas implanted with a biodegradable composite polymer. J Bone Joint Surg Am 1999; 81 A(12):1717-29.

58. Nash TJ, Howlett CR, Martin C, Steele J, Johnson KA, Hicklin DJ: Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. Bone 1994;15(2):203-8.

59. Parikh SN: Bone graft substitutes: past, present, future. J Postgrad Med 2002, 48(2): 142-8.

60. Ege R: Vertebra Omurga,Türk Hava Kurumu Basımevi Ankara 1992, s:257-308.

61. 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 1994 ;28:323-30.

62. Michalsky MP, Lara-Marquez M, Chun L, et al. Heparinbinding EGF-Like growth factor is present in human amniotic fluid and breast milk. J Pediatr Surg 2002; 37:1-6.

63. Dahl L, Hopwood JJ, Laurent UBG, et al. The concentration of hyaluronate in amniotic fluid. Biochem Med 1983;30(3): 280-83.

64. Toole BP. Developmental role of hyaluronate. Connect Tissue Res 1982;10: 93-6.

65. Bayramiçli M: Deneysel mikrobiyoloji(ARGOS iletişim hizmetleri reklamcılık

ve ticaret A.Ş.), 1. Baskı, İstanbul,2005 ; 122, 128-55.

66.Burchardt H. The Biology of bone graft repair. Clin Orthop 1983;174: 28–42.

67. Oikarinen J, Korhonen LK. Repair of bone defects by bone inductive material. Acta Orthop Scand 1979;50: 21–6.

68.Mordjetko SM , Connolly PS,Shott S.Dejenerative lumbar spondylolisthesis: A meta -analysis of literature 1970-1993 .Spine 1994 ;19(20)2256-65.

69 .Yuan HA ,Gorfin SR,Dickman CA ,et al .A historical cohort study of pedicle screw fixation in thoracic ,lumbar and spinal fusions.Spine 1994 ;19(suppl 20):2279-96.

70.Zdeblick TA . A prospective ,randomized study of lumbar fusion .Preliminary result .Spine 1993;18.983-91.

71. Özgenel GY: The influence of human amniotic fluıd on the potential of rabbit ear perichondral flaps to form cartilage tissue. Br J Plast Surg 2002; 55 (3): 246-50.

72. Kerimoğlu S MD, Livaoğlu M MD, Sönmez B MD, Yuluğ E MD: Effect of human amniyon fluıd on fracture healing on rat tibia. Journal of Surg. Research 2009 ; 152(2): 281-7.

73. Aslan M, SimsekG, Dayi E:The effectof hyauronic acid-supplemented bone graft in bone healing: experimental sudy in rabbits. J Biomater Appl 2006 ;20(3):209-20

74. Tuli SM, Singh AD. The osteoinductive property of decalcified bone matrix: An experimental study. J Bone Joint Surg 1978;60B:116–23.

75.Chalmers J, Gray DH, Rush J. Observations on the induction of bone in soft

tissues. J Bone Joint Surg 1975;57B:36–45.

76. Hulth A, Johnell O, Henricson A. The implantation of demineralized fracture matrix yields more new bone formation than does intact matrix. Clin Orthop 1988;234:235–49.

77. Lindholm TS, Ragni P, Lindholm TC. Response of bone marrow stroma cells to demineralized cortical bone matrix in experimental spinal fusion in rabbits. Clin Orthop 1988;230:296–302.

78. 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 2006;Vol.6: 391-96.

79. Dimar, John R II MD, Ante, William A, BS: Zhang, Y Ping PhD, Glassmann, Steven D MD: The effects of nonsteroidal anti-inflamatuary drugs on posterior spinal fusions in the rat. The Spine 1996;Vol. 21: 1870-76.

80. Huang, Russel C MD, Khan, et al Alendronate inhibits spine fusion in a rat model. The Spine 2005;Vol.30: 2516-22.

81.Jorgenson SS, Lowe TG,France S,et al.A prospective analysis of autografts versus allograft in posterolateral lumbar fusion in the some patient ; A minimum of 1 year follow –up in 144 patients .Spine 1984;19(18):2048-53

82. Lenke LG, Bridwell KH, Bullis D, et al. Results of in situ fusion for isthmic spondylolisthesis. J Spınal Disord 1992;5: 433–42.

83. SE Emery, MS Brazinski, A Koka, JS Bensusan and S Stevenson .The biological effect and biomechanical effect of irradiation on anterior spinal bone grafts in a canine model .J Bone Joınt SurgAm 1994;76:540-48

84. George J. Martin, Jr, MD, Scott D. Boden, MD , Louisa Titus, PhD, and Nelson L. Scarborough, PhD. New Formulations of Demineralized Bone Matrix as a More Effective Graft Alternative in Experimental Posterolateral Lumbar Spine Arthrodesis . Spıne 1999; 24(7): 637–45

85. Albert Juang Ming Yee, MD, Hyun W. Bae, MD, Darin Friess, MD, Mark Robbin, MD, Brian Johnstone, PhD and Jung U. Yoo, MD. Augmentation of Rabbit Posterolateral Spondylodesis Using a Novel Demineralized Bone Matrix-Hyaluronan Putty Spıne 2003; 28(21): 2435–40 .

86. Raj D. Rao, Krishnaj Gourab, Vaibhav B. Bagaria, Vinod B. Shidham, Umesh Metkar and Brian C. Cooley The Effect of Platelet-Rich Plasma and Bone Marrow on Murine Posterolateral Lumbar Spine Arthrodesis with Bone Morphogenetic Protein *J Bone Joint Surg Am.* 2009;91: 1199-1206.

87. David A. Jonathan N.,Roberto Lugo, Nancy Troiano, and Gary E. Comparison of Posterolateral Lumbar Fusion Rates of Grafton Putty and OP-1 Putty in an Athymic Rat Model Spıne2004; 29 (15) :1612–17.

88.Bos GD, Goldberg VM, Gordon NH et al. The long term fate of fresh and frozen orthotopic bone allografts in genetically defined rats. Clin Orthop 1985;197:245-54.

89.Bassewitz H.Wong JC , Kanim LEA ,et al .The morbidity of iliac crest bone graft.A comporison between harvesting using acetabular reamers and traditional methods.Proccedings the 66th Annual Meeting of the AOS,Aneheim ,CA,1999.

90.Brodsky, AE,Khalil MA,Sassard WR,et al.Repair of symptomatic pseudoarthrosis of ant.cervical fusion :Post VS. ant Repair.Spine 1992 ;17:1137-43.

91.Brown MD , Malinin TI, Davis PB.A roentgenographic evaluation of frozen allografts versus otogrefts in or anterior cervical spine fusions.Clin Orthop 1976;11(8):119-21.

92.Young WF , Rossenwaser RH .An early comparative analysis of the use of tibular allografts versus autologous iliac crest graft for interbody fusion after ort.cervical discectomy .Spine ,1983;18:1123-24.

93.Zhang ZH,Yin H,Yong K ,et al.Anterior intervertebral disc excision and bone grafting in cervical spondylitic myelopathy. Spine 1983 ;8:19-20.

94. Sasaki T, Watanabe C. Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high-molecular hyaluronic acid. Bone 1995; 16:9.

95. Hofmann GE, Abromowicz JS: Epidermal growth factor (EGF) concentrationsin amniotic fluıd and maternal urıne durıng pregnancy. Acta Obstet Gynecol Scand,1990; 69:217-22.

96. Varner MV, Dildy GA, Hunter C,et al.: Amniotic fluıd epidermal growth factor levels in normal and abnormal pregnancies. J Soc Gynecol Investig. 1996;3: 17-9.

97.Sasord WR, Eidman DK, Gray PM,et al.Augmenting local bone with Grafton DBM for posterolateral lumbar spine fusion.Spine 1993;17:1452-58.

98. Martin GJ Jr, Boden SD, Titus L, Scarborough NL. New formulations of demineralized bone matrix as a more effective graft alternative in experimental posterolateral lumbar spine arthrodesis. Spine. 1999;24: 637-45.

99. Frenkel SR, Moskovich R, Spivak J, Zhang ZH, Prewett AB. Demineralized bone matrix. Enhancement of spinal fusion. Spine. 1993;18: 1634-9

100. Morone MA, Boden SD. Experimental posterolateral lumbar spinal fusion with a demineralized bone matrix gel. Spine. 1998; 23: 159-67.

101.Bridwell KH,Lenke LG,Mc Enery KW,et al :Anterior fresh – frozen structural allografts in the thoracic and lumbar spine ;do they work if combined with posterior fusion and instrumentation in adult patients with kyphosis or anterior column defects?Spine 1995;20:1410-8.

T.C.

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. Turan Cihan DÜLGEROĞLU'ya ait "**Deneysel Vertebral Füzyon Üzerine Kemik Greftleri Ve İnsan Amniyon Sıvısının Etkileri"** adlı çalışma, jürimiz tarafından Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 28/10/2011

İmza

Başkan: Mahmut Ağın .....

Üye: Prof.Dr.Cüneyt Tok .....

Üye: Mehmet Öner .....

Üye: Ahmet GÜNEŞ .....

Üye: .....

Prof. Dr. Kudret DOĞRU
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi
Hastaneleri Başhekimi