

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ
ANABİLİM DALI

RATLARDA EPİDURAL FİBROZİS ÜZERİNE
TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMANIN ETKİSİ:
DENEYSEL ÇALIŞMA

Dr. Serkan GÜLER

UZMANLIK TEZİ

İZMİR – 2013

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ
ANABİLİM DALI

RATLARDA EPİDURAL FİBROZİS ÜZERİNE
TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMANIN ETKİSİ:
DENEYSEL ÇALIŞMA

UZMANLIK TEZİ

Dr. Serkan GÜLER

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Ömer AKÇALI

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	III
TABLO LİSTESİ	IV
ŞEKİL LİSTESİ	V
RESİM LİSTESİ	VI
KISALTMALAR.....	VII
ÖZET	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Omurga Anatomisi.....	4
2.2 Yangı.....	7
2.2.1 Akut Yangı.....	7
2.2.2 Kronik Yangı	7
2.2.3 Onarım	8
2.2.4 Fibrozis (skar oluşumu)	8
2.3 Epidural Fibrozis.....	9
2.3.1 Epidural Fibroziste Deneysel ve Klinik Tedavi Yöntemleri	10
2.4 Başarısız Bel Cerrahisi Sendromu	11
2.5 DuraGen Plus™ (kollajen dural matriks)	13
2.6 Trombositten zengin plazma (TZP)	13
2.6.1 Trombositten zengin plazmanın (TZP) kullanım alanları	14
2.6.2 Trombositten zengin plazma elde edilmesi	15
3.GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1 Deneklerin nörolojik değerlendirilmesi	17
3.2 Deneklerin gruplandırılması	18
3.3 Anestezi tekniği	19

3.4 Cerrahi teknik	20
3.5 Histolojik değerlendirme	26
3.5.1 Rutin ışık mikroskopisi doku takibi protokolü	26
3.5.2 Hematoksilen-Eozin boyama metodu	27
4.BULGULAR.....	29
4.1 Deneklerin klinik değerlendirme sonuçları	29
4.2 Deneklerin histolojik değerlendirme sonuçları.....	30
4.3 İstatistik değerlendirme sonuçları.....	36
5.TARTIŞMA	38
6. SONUÇLAR	42
7. KAYNAKLAR.....	43

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca deneyimlerinden ve bilgilerinden büyük fayda gördüğüm sayın hocalarım; başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Hasan Havıtcıoğlu, Prof. Dr. Emin Alıcı, Prof. Dr. Şükrü Araç, Prof. Dr. Osman Karaoğlu, Prof. Dr. Ahmet Ekin, Prof. Dr. Halit Pınar, Prof. Dr. Haluk Berk, Prof. Dr. İzge Günel, Prof. Dr. Önder Baran, Prof. Dr. Vasfi Karatosun, Prof. Dr. Mustafa Özkan, Prof. Dr. Ömer Akçalı, Prof. Dr. Can Koşay, Prof. Dr. A.Kadir Bacakoğlu, Yard. Doç. Dr. Mehmet Erduran, Yard. Doç. Dr. Safa Satoğlu, Uzm. Dr. Ahmet Karakaşlı, Uzm. Dr. Onur Hapa'ya teşekkür ederim.

Tezim ile ilgili her konuda bana yardımcı olan ve tez danışmanlığımı yapan sayın Prof. Dr. Ömer Akçalı'ya ayrıca teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca kliniğimizde beraber çalıştığım ve çok iyi arkadaşlıklar kurduğum başta tezimde bana yardımcı olan Uzm. Dr. Baran Şen olmak üzere asistan hekim arkadaşlarıma, hemşire arkadaşlarıma, personel arkadaşlarıma, sekreterlerimize teşekkür ederim.

Tezimin histolojik preparatlarının hazırlanmasında ve değerlendirilmesinde bana yardımcı olan Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalından Doç. Dr. H. Alper Bağrıyanık ve Uzm.Dr.Serap Cilaker Mıcılı'ya teşekkür ederim.

Yine tezimin trombosit zengin plazma hazırlığında yardımcı olan , Hematoloji laboratuvarından Prof.Dr.Mehmet Ali Özcan, Prof.Dr. Hayri Özsan ve Uzm.Dr. Namık Kemal Şanlı' teşekkür ederim.

Hayatım boyunca desteğini esirgemeyen, annem, babam ve kardeşime, tezimin her aşamasında yanımda olan eşim Cemile Güler'e teşekkür ederim.

Dr.Serkan GÜLER

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Epidural fibrozisi önlenmeye yönelik çalışmalarda kullanılan materyallerin bir kısmı.

Tablo 2: Başarısız bel cerrahisi sendromunun sık görülen yapısal nedenleri.

Tablo 3: Trombositlerin içindeki büyüme faktörleri ve etkileri.

Tablo 4: TZP'nin Ortopedi dışındaki kullanım alanlarına örnekler.

Tablo 5: BBB Nörolojik derecelendirme skorlaması.

Tablo 6: Rutin ışık mikroskopisi doku takibi protokolü.

Tablo 7: Hematoksilen - Eozin boyama metodu.

Tablo 8: Histolojik fibrozis evreleme skalası.

Tablo 9: 24.saat erken nörolojik skarlama (arka ekstremite hareketleri).

Tablo 10: 48. saat geç nörolojik skarlama.

Tablo 11: Histolojik incelemelerin non-parametrik değerlendirilmesinin sonuçları.

Tablo 12: Kruskal Wallis testi ile üç grup karşılaştırmasının istatistik sonuçları.

Tablo 13: Mann-Whitney U testi ile grupların ikili karşılaştırmaları.

Tablo 14: Kruskal Wallis testine göre her üç grubun 24.saat ve 48.saat nörolojik bulgularının değerlendirilmesi.

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Deneklerin gruplandırılma şeması.

Şekil 2: Serbest otojen yağ yastıkçığı grubu histolojik verilerinin grafiksel dağılımı.

Şekil 3: Kollajen dural matriks grubu histolojik verilerinin grafiksel dağılımı.

Şekil 4: TZP grubu histolojik verilerinin grafiksel dağılımı.

RESİM LİSTESİ

Resim 1: Omurga anatomisi (Frank H. Netter İnsan Anatomisi Atlası 2002, isimli kitaptan alınmıştır).

Resim 2: Omurga aksiyel kesit anatomisi (Annals of Anathomy 2011, isimli kitaptan alınmıştır) .

Resim 3: İntraperitoneal anestezi uygulama metodu.

Resim 4: Prone pozisyona alınmış, tıraş ve cerrahi saha temizliği yapılmış denek.

Resim 5: Kullanılan steril cerrahi set.

Resim 6: Cilt temizliğinden sonra, cerrahi sahanın steril cerrahi örtüyle örtülmesi.

Resim 7: Cilt insizyonu.

Resim 8: Fasya diseksiyonu ve ekartasyon.

Resim 9: Diseksiyon ve laminektomi sonrası ortaya çıkarılmış dura mater.

Resim 10: Serbest otojen yağ grefti uygulaması.

Resim 11: Laminektomi sahasına uygulanmış kollajen dural matriks.

Resim 12: İntrakardiyak kan alımı.

Resim 13: TZP hazırlığı .

Resim 14: TZP'nin laminektomi sahasına uygulanışı.

Resim 15: Blok çıkarılmış lomber omurga kısmı.

Resim 16: Örneklerin harflerle adlandırılması.

Resim 17: Serbest yağ yastıkçığı uygulanan örnek (10X büyütme).

Resim 18: Serbest yağ yastıkçığı uygulanan örnek (20X büyütme).

Resim 19: Kollajen dural matriks uygulanan örnek (10X büyütme).

Resim 20: Kollajen dural matriks uygulanan örnek (20X büyütme).

Resim 21: TZP uygulanan gruptan alınan örnek (10X büyütme).

Resim 22: TZP uygulanan gruptan alınan örnek (20X büyütme).

KISALTMALAR

MRG: Magnetik Rezonans Görüntüleme

BBCS: Başarısız Bel Cerrahisi Sendromu

IL: İnterlökin

TNF: Tümör Nekroze Eden Faktör

ELAM-1: Endotel Lökosit Adezyon Molekülü

ICAM-1: İntraselüler Adezyon Molekülü

VCAM: Vasküler Selüler Adezyon Molekülü

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü

PDGF: Platellet Kökenli Büyüme Faktörü

EGF: Epidermal Büyüme Faktörü

IFN: İnterferon

TZP: Trombositten zengin plazma

dk: dakika

RATLARDA EPİDURAL FİBROZİS ÜZERİNE TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMANIN ETKİSİ: DENEYSEL ÇALIŞMA

ÖZET

Bu çalışmada amacımız laminektomi uygulanmış rat modellerinde Trombositten Zengin Plazma' nın, epidural fibrozis gelişimi üzerine etkisini serbest yağ flebi ve kollajen matriks ile karşılaştırmak; böylece rutin kullanımda hastanın kendi kanından elde edilebilecek bir materyali ucuz, etkili ve yan etkisi olmayan bir tedavi seçeneği olarak ortaya koymaktır.

Çalışmamızda deney hayvanları etik kurul (16 KASIM 2012 tarihli 61/2012 protokol nolu) onayı alındıktan sonra, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında yetiştirilen, normal motor aktiviteye sahip, 29 adet Wistar Albino türü 250-300 gram ağırlığında erişkin erkek ratlar kullanıldı. Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) skorlaması ile preoperatif ve postoperatif nörolojik değerlendirmeler yapıldı.

Denekler 3 gruba ayrıldı. 1. gruptaki ratlara (n : 7) laminektomi yapıp dura üzerine yağ yastıkçığı uygulandı. 2. gruptaki ratlara (n : 7) laminektomiden sonra dura üzerine eşit ölçütlerde (4 x 2.5 mm) kollajen dural matriks (DuraGen Plus™) uygulandı. 3. gruptaki ratlara (n : 7) laminektomiden sonra dura üzerine tek doz 1,5 cc TZP uygulandı. Bu grupta uygulanacak olan TZP için ek 7 adet rat kardiyak kan alımı amacıyla kullanıldı. Bir adet rat ise pilot çalışma amaçlı kullanılmış olup çalışmaya dahil edilmemiştir. Her 3 gruptaki ratlar 4. hafta sonunda sakrifiye edildi. Sakrifikasyon sonrası laminektomi sahasının bir alt ve bir üst intervertebral disk aralığından 20 numara bistüri ile transvers olarak blok halinde çıkarıldı. Histolojik incelemeler Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalında, gruplar hakkında daha önceden bilgilendirme yapılmamış tek bir uzman histolog tarafından ışık mikroskopisi ile yapıldı. Epidural fibrozisin derecelendirilmesinde He ve arkadaşlarının yöntemi kullanıldı.

Bulgular değerlendirildiğinde, kollajen dural matriks uygulanan grupta fibrozisin daha çok olduğu saptanmış ve bu grupta skar gelişimi gözlenmiştir. TZP ile kollajen matriks arasındaki bu farklılık istatistiksel olarak da anlamlıdır ($p < 0.05$). Serbest yağ flebi ve TZP uygulanan grupların fibrozis evrelendirmeleri birbirine benzemekle birlikte gözlemsel olarak fibrozis gelişiminin TZP grubunda az olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak epidural fibrozisin önlenmesi için laminektomi uygulanan hastalarda TZP kullanımı kollajen matrikse göre daha az fibroze yol açabilir. Üretim maliyeti ve insanlarda otojen kaynaklı elde edilebilmesi önemli avantajları olarak kabul edilebilir.

THE EFFECT OF PLATELET RICH PLASMA ON EPIDURAL FIBROSIS IN A RAT LAMINECTOMY MODEL

ABSTRACT

The aim of this study is to evaluate the histologic effects of platelet rich plasma which can be obtained from the patient's own blood and can be used effectively and without side effects to prevent epidural fibrosis; and to compare this effect with free fat flap and collagen matrix.

In our study the approval of the ethical committee of experimental animals (16 November 2012 dated, 61/2012 Protocol number) has been received. 29 Wistar albino adult male rats between 250 to 300 grams in weight and with normal motor activity were obtained from Dokuz Eylul University School of Medicine Animal Experiments Laboratory. Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) scoring rates were performed and recorded at the preoperative and postoperative period to all subjects for neurological assessment.

The subjects were divided into 3 groups. All groups consisted of seven subjects. In Group 1 (fat pad group) only autogenous fat pad applied to the laminectomy site. In Group 2 (collagen matrix group) laminectomy defect was covered with collagen dural matrix in dimension of 4x2.5mm (DuraGen Plus™, Integra Lifesciences Corporation 311 Enterprise Drive Plainsboro, NJ 08 536). Platelet-rich plasma was applied to the laminectomy areas with single doses as 1.5cc each of rats in Group 3. 7 rats were killed after cardiac puncture blood supplies for the preparation of platelet-rich plasma. One rat was used for the pilot study and not included in the statistical analysis. All 21 rats were sacrificed after the 4th week of the operations. Enblock excision of laminectomy site were performed and cleaned with saline solution, and carried to histology laboratory in formaldehyde solution. The histological light microscopy examination was made by one histology specialist with single blind method. Epidural fibrosis grading scale of He et al. is been used.

As a result, it was found that the collagen dural matrix leded statically more fibrosis ad scar development. Although fibrosis grades of free fat flap and the platelet rich plasma group were found similar, the platelet rich plasma application showed slightly lower fibrosis grades. Platelet rich plasma application causes less fibrosis after laminectomy when compared to collagen matrix. Costs and obtaining autogenous can be accepted as PRP's important advantages.

Keywords : epidural fibrosis, platelet rich plasma, PRP

1. GİRİŞ ve AMAC

Bel ağrısı, iş gücü kaybı nedenlerinde üst solunum yolu sistemi hastalıklarının ardından ikinci sırayı almaktadır. Olguların büyük bir kısmında iyileşme genellikle hafif derecede tıbbi girişim ile veya hiçbir müdahale olmaksızın sağlanır (1,2).

Teknoloji, sedanter yaşam, masa başı işlerin artışı gibi etkenlerinde katkısıyla gerçekleştirilen omurga cerrahisi işlemlerinin sayısı hızla artmıştır. Başta disk hastalıkları olmak üzere sık gerçekleştirilen bir işlem olan laminektomi sonrasında epidural fibrozis ortaya çıkabilmektedir. Nüks oranının yüksek olması ve yapışıklıklar sonrası nöral elemanların yaralanması gibi risklerin de fazla olması nedeniyle, bu olguların yeniden cerrahi girişimi pek tercih edilmemekte ve klinik başarı düşük olarak kabul edilmektedir (3,4).

Bu yüzden epidural fibrozis oluşmasını engelleme ya da geriletme amacıyla yoğun olarak çalışmalar yapılmaktadır.

Bu çalışmada amacımız laminektomi uygulanmış rat modellerinde Trombositten Zengin Plazma' nın (TZP) , epidural fibrozis gelişimi üzerine etkisini histolojik olarak incelemektir. Böylece hastanın kendi kanından elde edilebilecek bir materyalin, rutin kullanımda ucuz , yan etkisi olmayan ve etkin bir tedavi seçeneği olarak ortaya konmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Omurga Anatomisi

Omurga; 7 servikal, 12 torakal, 5 lomber, 5 sakral ve 4 koksigeal olmak üzere toplam 33 vertebradan oluşan bir sütundur. Vücut ağırlığını taşır ve sağlam bir destek oluşturur. Bir yandan da medulla spinalis için koruyucu bir zırh oluşturmaktadır (Resim 1).

Vertebra önde cisim (korpus) ve arkada arkus vertebradan (pediküller, laminalar, transvers çıkıntılar, artiküler çıkıntılar ve spinöz çıkıntı) ibarettir. İki vertebral korpus birbirine intervertebral diskle bağlıdır. Korpusun arka kısmı ile arkus vertebra arasında ise vertebral kanal bulunur ve omuriliği içinde barındırır. Omurganın arka ve yan kısmına doğru pedikülün alt ve üst kısımlarındaki girintiler intervertebral foramenleri oluşturur ve sinir kökleri bu bölgelerden omurgayı terk eder. Pediküllerden sonra arkus vertebra arkaya doğru yassılaşarak devam eder ve laminaları iki taraflı oluşturur. Bu kısımda ligamentum flavum arkada laminalar arasını kaplar. En arkada ve ortada spinöz çıkıntılar bulunur. Laminalar ve pediküller arasında ise artiküler çıkıntılar inferior ve süperior olarak yer alır. İki komşu vertebra artiküler çıkıntıları arasında faset eklem oluşmuştur. Bu eklem omurganın tek gerçek sinovial tipte eklemidir. Arkus vertebranın her iki tarafında ise yanlara uzanan transvers çıkıntılar bulunur. M. iliocostalis , m. semispinalis, m. multifidus, m. longissimus gibi erektör kaslar işte bu transvers çıkıntılara tutunarak omurganın dik postürüne katkıda bulunurlar (5).

Lomber vertebraların diğer vertebralardan farklı olarak büyük korpusları; geniş ve böbrek şeklindedir. Pedikülleri daha kuvvetlidir. Laminaları kalındır. Faset eklemleri daha büyüktür. Foramen transversiyumları yoktur. Spinöz çıkıntıları daha kalın kısa, dörtgen şekillidir. Transvers çıkıntıların üstünde mamiller çıkıntı ve aksesuar çıkıntıları vardır. Bu bölgede vertebral kanal üçgen şeklindedir ve torakal bölgeden daha geniş, servikal bölgeden daha dardır (6).

İki vertebra korpusu mesafesinde hyalin kıkırdak tabakaları arasında fibrokartilaginöz yapıda intervertebral diskler bulunur. Ani artan yüklenmede süspansiyon görevi yapan yarı elastik bu yapılar vertebraların birbiri üzerinde hareketine olanak sağlamakla birlikte ileri yaşlarda esneklikleri azalarak kaybolur. Her bir diskin anulus fibrosus denilen periferik parçası ve nükleus pulposus denilen santral bir parçası vardır. Anulus fibrosus, fibrokartilaginöz yapıdadır. Kollajen lifleri konsantrik lameller veya kılıf şeklinde dizilmişlerdir. Kollajen bantlar komşu vertebraların gövdeleri arasında oblik olarak uzanırlar. Komşu lamellerde liflerin eğimi birbirine zıttır. En dıştaki çoğu lifler vertebral kolonun ön ve

arka longitudinal bağlarına sıkıca tutunurlar. Nükleus pulposus, adölsan ve çocuklarda büyük miktarda su, az sayıda kollajen lif, birkaç kıkırdak hücresi içeren ovoid jelatinöz bir kitledir. Bu yapı normalde basınç altındadır ve diskin ön tarafından daha çok arka kenarına hafifçe yakın yerleşmiştir (6,7).



Resim 1: Omurga anatomisi (Frank H. Netter İnsan Anatomisi Atlası 2002, isimli kitaptan alınmıştır).

Medulla spinalis, iki posterior spinal arter ve bir anterior spinal arter olmak üzere longitudinal uzanan üç küçük arterle beslenir. Posterior spinal arter, medulla spinalisin iki tarafında doğrudan veya dolaylı olarak vertebral arterlerden çıkarlar. Arka spinal köklerine yakın olarak arkaya doğru uzanırlar. Vertebral arterlerden çıkan anterior spinal arter, fissura mediana anterior içinde aşağı doğru birleşerek tek arteri oluştururlar. A. spinalis anterior ve posterior foramen intervertebralelerden vertebral kanala giren a.radicularislerce desteklenirler. Medulla spinalisin venleri, internal venöz pleksusa drene olurlar (6).

Medulla spinalis; dura mater, araknoid mater ve pia mater olmak üzere üç katlı zar tabaka ile kaplıdır. Duramater en dıştaki membran olup medulla spinalis ve kauda ekinayı örten sık örgülü, sağlam, fibröz bir kılıftır. Yukarıda foramen magnumdan geçerek, beyni örten duranın meningeal yaprağı ile devam eder. Altta ikinci sakral vertebranın alt kenarı seviyesinde filium terminale olarak sonlanır. Dural kılıf, vertebral kanalda gevşekçe yerleşmiştir ve kanalın duvarlarından bir aralık ile ayrılmıştır. Bu aralık yumuşak yağsı bir doku ve internal venöz pleksus ile doludur. Duramater, intervertebral foramen içine doğru ilerleyerek her bir sinir kökü boyunca uzanır ve spinal sinirleri çevreleyen bağ doku (epineurium) ile devam eder. Dura materin iç yüzü potansiyel subdural aralık vasıtası ile araknoidden ayrılmıştır (Resim 2) (6).



Resim 2: Omurga aksiyel kesit anatomisi (Annals of Anathomy 2011, isimli kitaptan alınmıştır) .

2.2 Yangı

Doku bütünlüğünün bozulması sonrası ortaya çıkan yaranın yerel ve tepkisel bir yanıtla karşılaşmasına yangı denir. Onarım ve iyileşmenin birlikte, iç içe gerçekleştiği olayların toplamıdır. Yaraya sebep olan etken ilk önce hücrenin metabolizmasını etkiler. Ortama salınan mediyatörler ise yangıyı başlatır.

2.2.1 Akut Yangı

Akut yangı, lökositlerin zedelenme bölgesine ulaşması ile oluşan, zedelenmeye karşı ani ve erken oluşan bir yanıttır. Bu yanıt iki aşamada değerlendirilir.

1. Vasküler değişiklikler: Kan akımında artış sonucu oluşan vasküler çap değişiklikleri (vazodilatasyon) ve plazma proteinlerinin dolaşımdan uzaklaşmalarına izin veren (vasküler permeabilite artışı) yapısal değişikliklerdir.

2. Hücresel olaylar: Lökositlerin mikrodolaşımdan ayrılmaları ve zedelenme bölgesinde toplanmalarıdır (hücrelerin kümelenme ve aktivasyonu).

Bu iki olay sonrasında akut inflamasyonun 3 bileşkesi ortaya çıkar. Bunlar sıcaklık, kızarıklık ve şişmedir.

Zedelenmenin olduğu bölgede toplanan lökositler; etkenine göre enfeksiyona yol açan ajanın yok edilmesi, nekrotik doku ve antijenlerin parçalanması gibi olaylardan sorumludur. Vasküler staz sonrasında lökositler, endotel hücre yüzeylerine adhezyon molekülleri (ELAM-1, ICAM-1, VCAM-1) ve bazı reseptörlerin birbirleriyle etkileşimi (Sialyl Lewis X, Integrinler) ile yapışırlar. IL-1 ve TNF alfa'nın ise yapışmayı arttırıcı, inflamatuvar yanıtı güçlendirici etkileri vardır. Yapışmayı takiben lökositler, yuvarlanma ve salgılanan kollajenaz enzimi sayesinde endotellerin arasından bazal membranı geçip damar dışına çıkarlar (diapedezis). İlk 6-24 saatte zedelenen bölgede nötrofiller çoğunlukta, 24-48 saatte monositler ağırlık kazanır. Bu şekilde lökositlerin göç etmesine kemotaksis denir. Endojen (kompleman sistemindeki faktörler, lökotrien B4 gibi) veya eksojen (bakteriyel ürünler) kemotaktik ajanlar lökosit yüzeyi spesifik reseptörlerine bağlanmasıyla lökositler aktive olur. Oponinler etkene bağlanır, lökositler üzerindeki FcR ve C3b gibi spesifik reseptörlerde oponinleri tanıyarak etkene bağlanır. Bağlanma sonrası reaktif oksijen türevleri ve lizozomal enzimlerle fagositoz sağlanır. Bu enzimler ve oksijen radikalleri aynı zamanda organizmanın kendisi için de zararlı olup bazı kronik yangısal hastalıkların oluşumunda rol oynarlar (8).

2.2.2 Kronik Yangı

Akut yangı dört farklı biçimde sonlanabilir.

1.Tam iyileşme (Rezölüsyon) : Ödem ve nekrotik artıklar lenfatik drenaj ve makrofajlarca ortadan kaldırılır. Doku, hiç hasar görmemiş gibi eski haline döner.

2.Skar dokusuyla iyileşme (Fibrozis) : Yenilenemeyen veya yenilenmesinde kısıtlılık olan durumlarda ortaya çıkar. Bağ doku elemanlarının büyümesi ile organize olur ve sonuçta fibrozis oluşur.

3.Abse Oluşumu : Piyojenik enfeksiyonlarda görülen bir durumdur.

4.Kronik Yangıya Gidiş : Kemik iliğinden dolaşıma monosit olarak geçen ve daha sonra dokulara yerleşen makrofajlar, kronik yangıdaki en önemli hücrelerdir ve IFN-gama ile aktive olurlar. Fagositoz doku hasarına yol açan mediyatörlerin ve fibrozise neden olan ajanların salınımından sorumludur. Diğer taraftan ise elastaz ve kollajenaz gibi enzimlerle de fibrozisi sınırlandırır. Lenfositlerde kronik inflamasyonda rol oynarlar. Çeşitli sitokinler salgılayarak monosit ve makrofaj aktivasyonunu sağlarlar. Kronik yangıda, akuttan farklı olarak doku yıkımı ve fibrozis temel olaylardır. Ortaya çıkan fibrozis organ fonksiyon bozukluğunun önemli bir nedenidir (8,9,10).

2.2.3 Onarım

Onarım iki şekilde sonuçlanabilir. Doku köken aldığı hücre ailesinin özelliklerini taşıyabilir ya da fibrozis ile onarılabilir.

Yıkıma uğrayan hücrelerin onarımı genellikle skar oluşumuna yol açan bağ dokusu proliferasyonu ile sağlanır. Anatomik bütünlük sağlanırsa da, parankim hücrelerinin yaralanma öncesindeki görevleri, özelleşmiş bağ doku onarımı nedeniyle geri gelemez. Skarlaşma, bir organ ya da dokunun görev ve fonksiyonlarını azaltır. Lomber bölgeye yönelik cerrahilerde de laminalar, paravertebral adele ve çevre yumuşak dokularda yenilenme kapasitesi çok kısıtlı olduğundan skar dokusu oluşumu sıktır (9).

Onarım safhası sırasıyla fibroblastların çoğalması, endotel hücrelerinin mitotik bölünmesi ve küçük kan damarlarının oluşumu ile başlar. Gelişen küçük endotel hücre tomurcukları eksuda içine doğru gelişerek granülasyon adı verilen damardan çok zengin, kırmızı tanecikli (granüllü) görünümde bir bağ dokusu oluştururlar. Bu doku eksudanın yerini alır ve doku kaybını doldurur. Makrofajlar fagositoz dışında fibroblastların çoğalması için de uyarıcı bir etki gösterirler (9).

2.2.4 Fibrozis (skar oluşumu)

Skar dokusu oluşumunun dört komponenti vardır.

1.Yeni damarların oluşumu (Anjiogenezis) : Ana damardan bazal membranın proteolitik ajanlarla parçalanması sonrası anjiogenik uyarı ile endotel hücre göçü gerçekleşir. Bu endotel hücreleri çoğalırlar. Kapiller damarlar için perisitler, daha büyük damarlar içinse

düz kas hücreleri bu endotel hücrelerinin olgunlaşmasına ve tüp şeklinde oluşumuna yardımcı olurlar. Fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) angiogenezi uyarır .

2.Fibroblast göçü ve çoğalma: Oluşan yeni damar çatısından meydana gelen gevşek hücre dışı matriks ve granülasyon dokusuna fibroblastlar göç edip çoğalma gösterirler.

3.Hücre dışı matriks depolanması: Bu aşamada damarlanma azalmaya fibroblastlar artmaya başlar ve kollajen hücre dışı matriks oluşmaya başlar.

4.Fibröz doku matürasyonu ve yeniden biçimlenmesi: Yara boyutuna bağlı olarak haftalarca sürebilir. Sonuç olarak granülasyon dokusu; büyük ölçüde inaktif işsel biçimli fibroblastlar, dens kollajen, elastik doku parçaları ve diğer hücre dışı matriks bileşiklerinden oluşan skar dokusuna dönüşür (9).

2.3 Epidural Fibrozis

Epidural fibrozis laminektominin doğal bir sonucudur. Cerrahi girişim sahasında aşırı skar dokusu oluşumudur (11,12). Bu skar dokusu Martinez ve arkadaşları tarafından ‘cheloide meningeae’, La Rocca ve McNab tarafından da ‘Laminektomi membranı’ olarak adlandırılmıştır (13). Literatürde, skarın dokular arasında yapışıklıklar yaparak veya yoğun fibrotik dokunun çevre anatomik yapılara baskı yapması sonucu klinik olarak önemli sekillere neden olabildiği rapor edilmiştir (14). Fibrozis ile ilgili problemlerin oranı konusunda bir fikir birliği olmamasına rağmen, pek çok çalışmada eğer alternatif bir kemik veya disk patolojisi yok ise lomber disk cerrahi girişimlerinden sonra tekrarlayan semptomların nedeninin fibrozis olabileceği üzerinde durulmuştur (15). Tekrar cerrahi girişim gerektiren sebeplerin %24’ünün epidural fibrozis olduğu belirtilmektedir (16).

Posterior omurga cerrahisi geçirmiş hastalarda tüm tedavi seçenekleri uygulanmasına rağmen epidural fibrozise ve buna bağlı post operatif bacak ağrıları sürebilmektedir. Kanama, sinir kökünün aşırı ekartasyonu, cerrahi girişimde kullanılan yabancı materyallerin doku reaksiyonları etiyolojide suçlanmıştır. Epidural fibrozis; dura ve sinir köklerine, erektör spina kaslarına, intervertebral disk ve vertebra cisminde yapılarak klinik tabloyu oluşturur. Fibrozis spinal köklerde çekme, germe veya baskı oluşturarak radiküler ağrı oluşturur. Özellikle ileri post operatif dönemde ağrı, duyu ve motor defisitler bile ortaya çıkabilir (4,17). Genel cerrahi prensipler göz önüne alındığında epidural fibrozisi artıran faktörler başlıca;

- Potansiyel ölü boşluğun büyüklüğü,
- Cerrahi girişim sahasında hematoma olması,
- Paraspinal cerrahi diseksiyonun büyüklüğü,
- Postoperatif enfeksiyon gelişmesi,
- Nekrotik bölge ve hasarlayıcı ajanların varlığı,
- Yabancı cisim varlığıdır (17).

Yapılan bir çalışmada araştırmacılar epidural fibrozisin; fibroblastların epidural mesafedeki hematoma içine göç ederek yoğun skar dokusu oluşturmasıyla geliştiğini bildirmişlerdir (18). Skar dokusunun azaltılması için cerrahi diseksiyonun az, hemostazın yeterli olması gerekir. İnsizyon büyüklüğü, yabancı cisim kullanım miktarı, potansiyel boşluğu ile denervasyon paternini artırır ve skar formasyonu miktarı artar (4). Mikrocerrahinin standart laminektomiye göre skar formasyon oluşumunda belirgin azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Bunun nedeni olarak da küçük insizyon, minimal ligamentum flavum ve lamina alımı gösterilmiştir (4,19).

2.3.1 Epidural Fibroziste Deneyisel ve Klinik Tedavi Yöntemleri

Lomber spinal cerrahi sonrası geçmeyen bel ağrısının en önemli etkenlerinden biri olarak görülen epidural fibrozisin önlenmesi amacı ile birçok biyolojik ve biyolojik olmayan materyaller denenmiştir. Semptomları gidermeye yönelik olarak medikal ajanlar (analjezikler, myorelaksanlar), steroid ve/veya lokal anestezi enjeksiyonları, fizyoterapi, istirahat, egzersiz ve bunların birlikte tercihi seçilebilir. Patolojiyi gidermeye yönelik standart, kabul görmüş ve kesin bir yöntem mevcut değildir. Fizik tedavi, istirahat ve egzersiz de yine medikal tedaviyi destekleyen semptomatik tedavilerdir. Skar dokusunun eksizyonu sonrasında hastalarda nöks sinir doku hasarı ve beyin omurilik sıvısı kaçağı sıktır (18,20). Yeniden opere edilen olguların %30-37' sinde başarı sağlanır (21).

Bu nedenle cerrahi tercih edilecekse komplikasyonların daha düşük olması nedeniyle mikrocerrahi yöntemleri tercih edilmelidir (19). Epidural fibrozisi önlemeye veya geriletmeye yönelik birçok klinik ve deneysel çalışma yapılmış olmasına rağmen istenen başarılı sonuçlar tam olarak elde edilememiştir. Deneysel çalışmalarda laminektomi defektlerinde skar dokusu ve yapışıklık oluşumunu önlemede kullanılan materyallerin bir kısmı Tablo 1'de verilmiştir.

1.Serbest otojen yağ greftleri	10.Karboksi metil sellüloz	19.Radyasyon
2.Pediküllü yağ greftleri	11.Temozolamid	20.IF gama
3.Amniyotik membran	12.Non-steroid antienflamatuar ajanlar	21.Çitin
4.DuraGen Plus™	13.Alfa lipoik asit	22.Sitikolin
5.Politetrafloroetilen (Gore-tex™)	14.Hyaluronik asit	23.Deksametazon
6.Adcon-L™	15.Bal	24.Karbonhidrat polimer
7.Mitomisin-C	16.Düşük doz metilen mavisi	25.Takrolimus
8.5- Florourasil	17.Melatonin	26.Omentum
9.Oktreotid	18.Atrisorb	

Tablo 1: Epidural firozisi önlenmeye yönelik yapılan çalışmalarda kullanılan materyallerin bir kısmı.

2.4 Başarısız Bel Cerrahisi Sendromu

Postlaminektomi sendromu da denen bu sorunda, lomber cerrahi geçiren hastaların ya da cerrahın ameliyat öncesi beklentilerine tatminkar düzeyde yanıt alamadığı bel ve/veya bacak ağrısının devam ettiği iyileşmeme durumu söz konusudur. İnsidans ortalama %5-25 arası bildirilmektedir (22).

Başarısız bel cerrahisi sendromunun (BBCS) birçok nedeni tanımlanmıştır (Tablo 2). En sık görülen nedenler sırasıyla foraminal stenoz, ağrılı disk, psödoartroz, nöropatik ağrı, tekrarlayan disk herniasyonu, faset eklem ağrısı ve sakroiliak eklem ağrısıdır.

Başarısız bel cerrahisi sendromunu değerlendirmede en yararlı yardımcı görüntüleme yöntemi manyetik rezonans görüntülemedir. Epidural fibrozis olgularında gadolinyum kontrastlı MRG da tutulum artmıştır (22, 23).

Başarısız Bel Cerrahisi Sendromunun Sık Görülen Yapısal Nedenleri	Sıklık (%)
Foraminal stenoz	% 25-29
Ağrılı disk	% 20-22
Psödoartroz	% 14
Nöropatik ağrı	% 10
Tekrarlayan disk herniasyonu	% 7-12
İyatrojenik instabilite	% 5
Faset ağrısı	% 3
Sakroiliak eklem ağrısı	% 2

Tablo 2: Başarısız bel cerrahisi sendromunun sık görülen yapısal nedenleri

Ağrı kontrolü, rehabilitasyon ve tekrarlayan cerrahi girişimler, seçilmiş olgular için uygun tedavi seçenekleri olabilir. Ortaya çıkış zamanına göre ‘çok erken’, ‘erken’, ‘orta dönemde’ veya ‘geç dönemde’ şeklinde sınıflandırılabilir (22).

1-Çok erken dönem (yakınmaları hiç geçmemiş)

A- Cerrahiden yüksek beklenti

B- Yanlış tanı (örneğin tümör, enfeksiyon, osteomyelit gibi)

C- Yanlış hasta seçimi

D- Cerrahi teknikte hatalar (örneğin yanlış seviye/taf ameliyatı gibi)

2-Erken dönem (birkaç gün veya hafta içinde tekrarlayan ağrı)

A- Yanlış hasta seçimi

B- Cerrahi komplikasyonlar (enfeksiyon, psödomeningosel gibi)

C- Tekrarlayan disk herniasyonu

D- Bel kaslarında güçsüzlük

3- Orta dönem (birkaç hafta veya ay içinde tekrarlayan ağrı)

A- Tekrarlayan disk herniasyonu

B- Dura ve sinir kökü çevresinde postoperatif skar dokusu (Epidural fibrozis) oluşması

C- Psödoartroz

D- Araknoidit

4-Geç dönem (aylar veya yıllar içinde tekrarlayan ağrı)

A-Disk herniasyonu

B-Yeni seviyelerde stenoz

C-İnstabilite

D-Sekonder kazanç (22).

2.5 DuraGen Plus™ (Kollajen dural matriks)

Dural greftlere ilgi; post travmatik epilepsiler sonrası ortaya çıkan meningeserebral adhezyonlar ve beyinde skar formasyonu oluşumunu geriletmek üzerine başlamıştır.

Travma ya da cerrahi ile oluşan dural defektler sonrası dural iyileşme, ilk önce yeni membran oluşumu ile başlar. Fibroblastik aktiviteyle devam eder. Gliosis ya da fibrozis oluşumu ile neticelenir. Yakın zamanlarda ise ilgi; greftin alıcıda verdiği yanıtına yönelmiştir. Bir çok materyal kullanılmasına rağmen bunların büyük bir kısmı greft enkapsulasyonu, nöral bası, sonradan ortaya çıkan kanama gibi problemlere yol açabilmektedir. Uzun zamandır ise dural greft hammaddesi olarak kollajen kullanılmaktadır (24).

DuraGen Plus™(Integra LifeSciences Corporation 311 Enterprise Drive Plainsboro, NJ 08536, chemical cross-linked type 1collagen foam made from bovine tendon) genellikle kranial ya da dural defektleri kapatmak için greft olarak kullanılan sünger yapıda kollajen matrikstir. Yabancı cisim reaksiyonu oluşturmaz. 6-8 haftada rezorbe olur, enkapsüle olmaz. Subaraknoid bölgede fibrozisi azalttığını gösteren çalışmalar yayınlanmıştır (24, 25, 26). 47.2 °C’ de denatüre olur (25). Enfeksiyon oranlarında herhangi bir artışa neden olmamıştır (26). Sıklıkla dural greft olarak kullanılan duragenin epidural fibrozisi gerilettiği gösterilmiştir (27). Yabancı cisim reaksiyonu, fibrozis ile enkapsulasyon ve immun reaksiyonları azaltmak için saflaştırma işlemi yapılır. Yeniden steril edilemez (25, 28). DuraGen Plus™, in 2.5 cm x 2.5 cm, 2.5 cm x 7.5 cm, 5 cm x 5 cm, 7.5 cm x 7.5 cm, 10 cm x 12.5 cm, 12.5cm x 7.5 cm boyutlarında olan 6 çeşit ticari formu bulunmaktadır (28).

2.6 Trombositten Zengin Plazma

Trombositlerin alfa granüllerinin içinde büyüme faktörleri bulunmaktadır (Tablo 3). PDGF (platelet derived growth faktör), TGF-Beta (trombosit growth faktör), VEGF (vasküler endotelial growth faktör), IGF-1 (insülin growth faktör), PF-4 (platelet faktör) yara iyileşmesinde olumlu yönde etkileri ön plandadır. Trombositten zengin plazma ortamdaki trombosit miktarını, dolaylı olarak da büyüme faktörlerinin konsantrasyonunu artırır (29,30).

PDGF	DNA protein sentezini uyarır. Mezenkimal hücrelere mitogenetik etki eder. Endotelial hücrelere anjiogenetik etki eder.
TGF-β	Anjiogenezi artırır. Osteoblastlara ve endotelial hücrelere kemotaktik etki yapar. Osteoklastları inhibe eder.
VEGF	Damar permeabilitesini artırır.
IGF-1	Kıkırdak sentezini uyarır. Osteoblast proliferasyonunu artırır. Kemik matriks proteininde artışa sebep olur.
PF-4	Nötrofil ve fibroblastlara kemotaktik etki yapar.

Tablo 3: Trombositlerin içindeki büyüme faktörleri ve etkileri (31,34).

Zedelenme sonrası, ortama ulaşan trombosit alfa granülleri lizise uğrar. Böylece büyüme faktörleri salınır. Kemotaksis, hücre proliferasyonu, anjiogenezis, hücre dışı matriks şekillenmesi, yeniden şekillenme bu durumdan olumlu etkilenir (31,32). Trombosit kaynaklı büyüme faktörü molekülü insan mezenkimal hücreleri için birincil mitojen olan bir büyüme faktörüdür, hücre membran reseptörlerine bağlanır. Yüksek enerjili fosfat bağı içeren sitoplazmik sinyal proteini aktiflenir. Hücre çoğalması, anjiogenezis, kollajen, fibronektin ve hiyaluronik asit üretilmesi, diğer büyüme faktörleri ve hücrelerin fonksiyonlarının artmasına aracılık eder. Böylece fibroblastik ve osteoblastik faaliyetler artar, hücreler farklılaşır, büyüme faktörlerinin makrofaj gibi hücreler üzerindeki etkileri hızlanmış olur (32). Trombosit kaynaklı büyüme faktörünün kemik, periodontium ve deri iyileşmesini stimüle ettiği, yara kuvvetini artırdığı gösterilmiştir (31, 33, 34).

2.6.1 TZP' nin Kullanım Alanları

Teknolojik ilerlemeler sayesinde trombositleri de steril şartlar altında izole ve konsantre etmek mümkündür. Yeterli kontrollü çalışmalar dahilinde, immün reaksiyon ve hastalık bulaştırma riski olmayan, yan etkisi olmayan, tekrar tekrar elde edilebilen TZP; kullanımı yaygınlaşabilecek bir materyaldir (34). Ortopedi alanı dışında da yaygın olarak kullanılmaktadır (Tablo 4).

Whitman ve arkadaşları osteo integre titanyum implantlar ile yapılan maksillofasiyal rekonstrüksiyon ameliyatlarında TZP'yi ilk kez kullanılmışlardır (35).

Marx ve arkadaşları, 1998 de karşılaştırmalı çalışmada, mandibular defekt rekonstrüksiyonunda kullandıkları kansellöz kemik greftleri üzerine TZP uygulamışlar ve kemik iyileşmesi üzerindeki olumlu etkileri tespit etmişlerdir (32). Çok sayıda çalışma ise TZP'nin hazırlanış aşamalarını geliştirmek ve kullanım alanlarını genişletmek üzerine yoğunlaşmıştır.

Travma, cerrahi sonrası ya da doku iyileşmesinin beklendiği alanlarda kullanımı popüler olan bir materyaldir. Ortopedi ve travmatolojide tendon tamiri, diabetik yara tedavisi, kemik defekti onarımı, kemik uzatma ameliyatlarında kullanılmaktadır. Omurga cerrahisinde ise spinal füzyon ameliyatlarında titanyum implantlar etrafına uygulanan TZP, kemik rejenerasyonunu arttırmaktadır (30).

Ratlarda paravertebral kas lezyonlarında TZP uygulanması sonrası iyileşmede metaplazi, ossifikasyon ve heterotopik kalsifikasyon gözlenmemiştir (36).

Tavşanlarda disk dejenerasyon modeli sonrası iyileşmede olumlu etkisi saptanmış nukleus pulposus hücrelerinde kollajen matriks ve tip2 kollajen oranında artış gözlenmiştir (31).

Diş Hekimliği	Çene implantlarında (32)
Rekonstrüktif cerrahi	Kronik ülserler , cilt defektleri (33)
Maksillofasiyal ve periodontal cerrahi	Mandibular defektlerin tedavisinde (35)
Oküler cerrahi	Retinal yaralanmalarda (37)
Genel cerrahi	Kolon anastomozlarında (38)
Plastik cerrahi	Doku defekt kapamada (39)

Tablo 4: TZP'nin Ortopedi dışındaki kullanım alanlarına örnekler.

2.6.2 TZP Elde Edilmesi

Trombositten zengin plazma elde edilmesinde tam kan kullanılmaktadır. Kullanımdan hemen önce kan steril cilt temizliği sonrası alınıp santrifüj aşamasından geçmektedir. Yokota tavşandan aldığı 10 ml tam kanı sitratlı tüplerde önce 1500 devir/dakika'da 10 dakika çevirmiş ve dipte kalan kırmızı hücrelerden ayırmıştır. Üstte kalan kısmı 2500 devir/dakika'da beş dakika çevirmiş ve dipte kalan bir ml'lik kısım, trombosit zengin plazma kabul edilmiştir (40). 2004 yılında yapılan bir başka çalışmada buffy-coat (santrifüj

edilmiş kanda kırmızı kan hücreleri ile trombositler arasında kalan daha çok beyaz kan hücresi içeren kısım) ve üzerinde kalan plazmanın santrifüjünden sonra, birinci grupta alttaki 1/2'lik kısım ile ikinci gruptaki alt 1/3'lük kısım içindeki trombosit konsantrasyonu karşılaştırılmış, ikinci grupta konsantrasyon daha yüksek bulunmuş, bu nedenle alt üçte birlik kısmın alınması önerilmiştir (41). Bu işlemler sonrası elde edilen TZP gereksinim duyulan alana steril şekilde uygulamaya hazır hale gelir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda deney hayvanları etik kurul (16 KASIM 2012 tarihli 61/2012 protokol nolu) onayı alındıktan sonra, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında yetiştirilen, normal motor aktiviteye sahip 29 adet Wistar Albino türü 250-300 gram ağırlığında erişkin erkek ratlar kullanıldı.

3.1 Deneklerin Nörolojik Değerlendirmesi

Deneklerin tümünün ameliyat öncesi ve sonrası dönemde nörolojik değerlendirmesi Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) skorlamasına göre yapıldı ve kaydedildi (Tablo 5) (42).

I: İyileşmenin erken döneminde (Arka ekstremite hareketleri)	Puan
Gözlenebilen arka ekstremite (AE) hareketi yok	0
Bir veya iki eklemde hafif hareket (Genelde diz ve/veya kalça)	1
Bir eklemde geniş hareket/bir eklemde geniş hareket + diğer eklemde hafif hareket	2
İki eklemde geniş hareket	3
Üç eklemde hafif hareket (AE) (Kalça, diz, ayak bileği)	4
İki eklemde hafif hareket + üçüncü eklemde geniş hareket	5
İki eklemde geniş hareket + üçüncü eklemde hafif hareket	6
Üç eklemde geniş hareket (AE)	7
II: İyileşmenin orta döneminde (Adım atma koordinasyonu)	
Ağırlığını taşımadan sürünmek veya pençenin plantar yerleştirilmesi	8
Ağırlığını taşıyarak pençenin plantar yerleştirilmesi veya tek bir defa, ara sıra, sık sık, sürekli ağırlığını kaldırarak dorsal adımlama + plantar adımlama yok	9
Ara sıra ağırlığını taşıyarak plantar adımlama. Ön ekstremite (ÖE) arka ekstremite koordinasyonu yok	10
Sık, sürekli ağırlığını taşıyarak plantar adımlama ve ÖE, AE koordinasyonu yok	11
Sık, sürekli ağırlığını taşıyarak plantar adımlama ve ara sıra ÖE, AE koordinasyonu mevcut	12
Sürekli ağırlığını kaldırarak plantar adımlama ve sık sık ÖE, AE koordinasyonu	13

III: İyileşmenin geç döneminde (Ayrıntılar, ince hareketler)	Puan
Sürekli ağırlığını taşıyarak adımlama, sürekli ÖE, AE koordinasyonu veya hareket sırasında predominant pençe pozisyonunda yuvarlanma veya sık plantar adımlama, sürekli ÖE, AE koordinasyonu, arasıra dorsal adımlama	14
Sürekli ÖE, AE koordinasyonu, parmak temizleme hareketi yok veya ekstremitenin öne ilerletilmesi ile ara sıra parmak temizleme hareketi, ilk dokunuşta predominant pençe hareketi vücuda paralel	15
Yürüyüş sırasında sürekli ÖE, AE koordinasyonu, ekstremitenin öne ilerletilmesi ile sık sık parmak temizleme hareketi; ilk dokunuşta predominant pençe hareketi paralel ve kaldırıldığında yuvarlak	16
Yürüyüş sırasında sürekli ÖE, AE koordinasyonu, ekstremitenin öne ilerletilmesi ile sık sık parmak temizleme hareketi; ilk dokunuşta ve kaldırıldığında predominant pençe hareketi paralel	17
Yürüyüş sırasında sürekli ÖE,AE koordinasyonu ve ekstremitenin öne ilerletilmesi ile sürekli parmak temizleme hareketi, ilk dokunuşta predominant pençe hareketi paralel ve kaldırıldığında yuvarlak	18
Yürüyüş ile sürekli koordineli ÖE, AE hareketi, ekstremitenin öne hareketi ile sürekli parmağı temizleme hareketi; ilk dokunuşta ve kaldırıldığında predominant pençe hareketi paralel	19
Sürekli koordineli yürüyüş, sürekli parmak temizleme hareketi, ilk dokunuşta ve kaldırıldığında predominant pençe hareketi paralel; fakat gövde instabilitesi var; kuyruk sürekli havada	20
Koordineli yürüyüş, sürekli parmak temizleme, predominant pençe pozisyonu paralel, sürekli gövde stabilitesi, kuyruk sürekli havada.	21

Tablo 5: BBB Nörolojik derecelendirme skorlaması

3.2 Deneklerin gruplandırılması

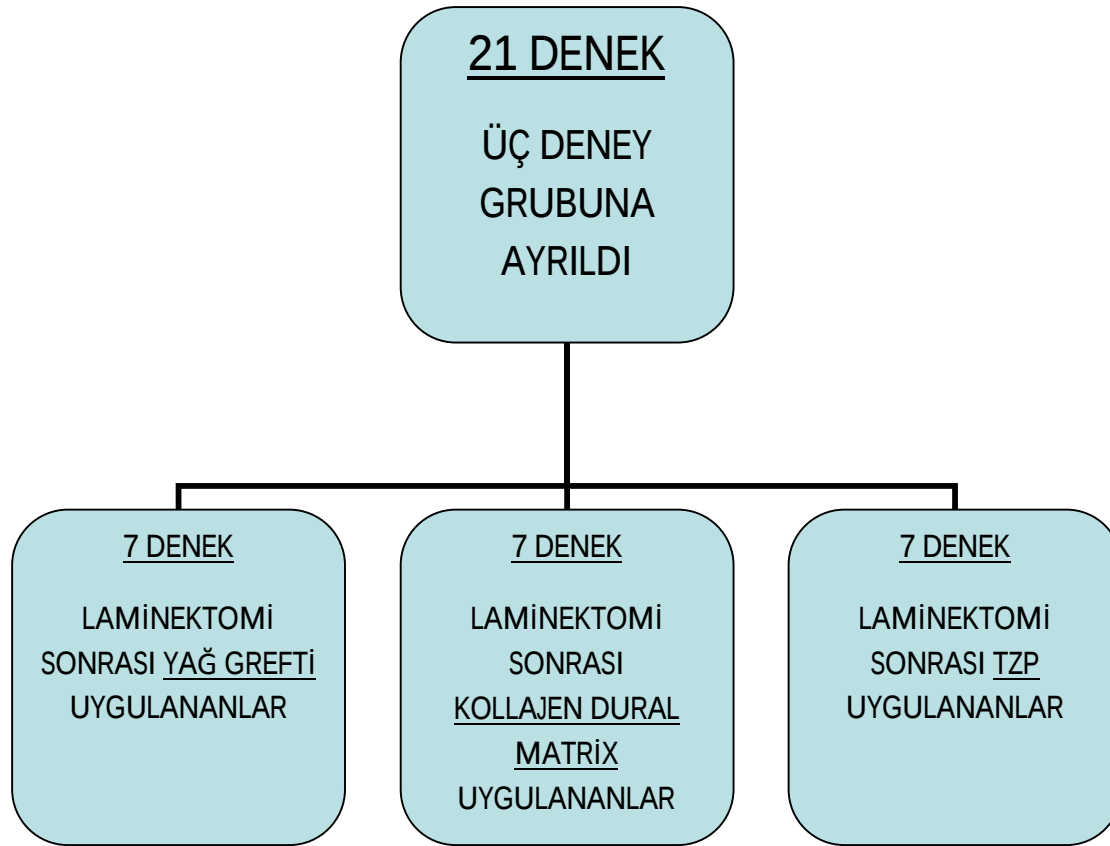
Denekler 3 gruba ayrıldı (Şekil 1).

1.Grup - Laminektomi grubu (n:7): Bu gruptaki ratlara laminektomi uygulanıp dura üzerine yağ yastıkçığı uygulandı.

2.Grup - Kollajen dural matriks grubu (n:7): Bu gruptaki ratlara laminektomiden sonra dura üzerine eşit ölçütlerde (4x2,5mm) kollajen dural matriks (DuraGen Plus™ Integra LifeSciences Corporation 311 Enterprise Drive Plainsboro, NJ 08536) uygulandı.

3.Grup - TZP grubu (n:7): Bu gruptaki ratlara laminektomiden sonra dura üzerine tek doz 1,5 cc TZP uygulandı. Bu grupta uygulanacak olan TZP için 7 adet rat kardiyak kan alımı için kullanıldı (43).

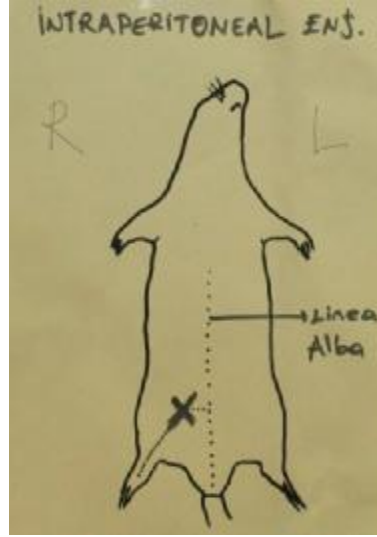
Bir adet rat ise pilot çalışma amaçlı kullanılmış olup çalışmaya dahil edilmemiştir.



Şekil 1: Deneklerin gruplandırılma şeması.

3.3 Anestezi Tekniği

İntraperitoneal ketamin hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı, İstanbul-Türkiye) 35mg/kg ve xylazine hydrochlorid (Rompun, Bayer, İstanbul-Türkiye) 5 mg/kg ile başlangıç anestezisi sağlandı (Resim 3). Gerektiğinde saatlik olarak ilk dozun 1/3' ü ilave dozlar halinde tekrarlandı. Anesteziden sonra denekler yüzükoyun pozisyonda tespit edildi. Lomber bölgesi tıraş edilerek cilt temizliği yapıldı. Polividoniyot (Batticon, Adeka, Samsun) ile lokal antisepsi sağlandı.



Resim 3: İntraperitoneal anestezi uygulama metodu.

Denekler kilo ölçümü, anestezi , cerrahi bölge traşlama ve cilt temizliği sonrası ; prone pozisyonda ameliyat masalarına alındılar (Resim 4).



Resim 4: Prone pozisyona alınmış ,tırış ve cerrahi saha temizliği yapılmış denek.

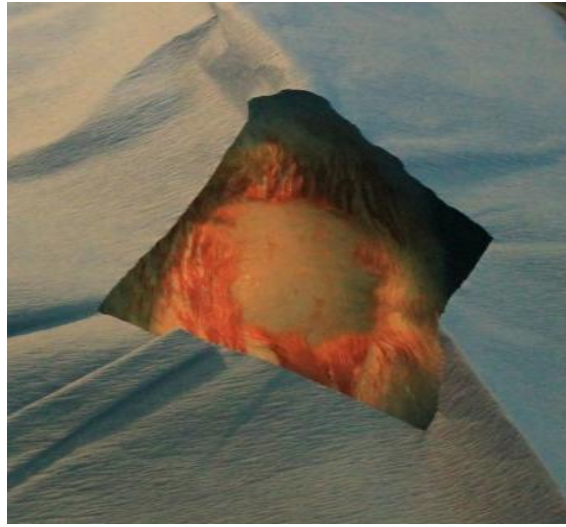
3.4 Cerrahi Teknik

Cerrahi girişimler tek cerrah tarafından aynı koşullarda yapıldı. Kullanılan cerrahi aletler, Avrupa Sterilizasyon Enstitüsü kriterlerine uygun olarak 135°C ve 2 atmosfer basınçta buhar otoklavda sterilize edildi (Resim 5).



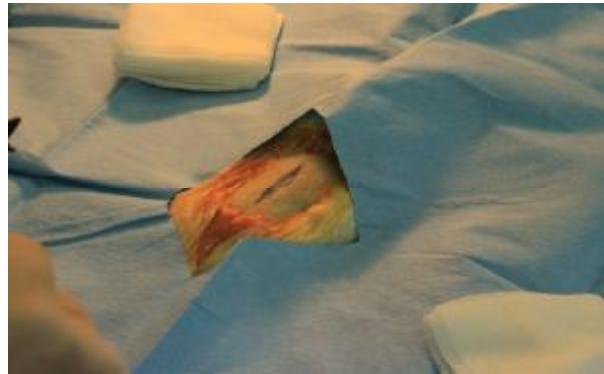
Resim 5: Kullanılan steril cerrahi set.

Deneklerin anestezi indüksiyonunun ardından cerrahi sterilizasyona uygun ameliyat sahası hazırlığı yapıldı (Resim 6).



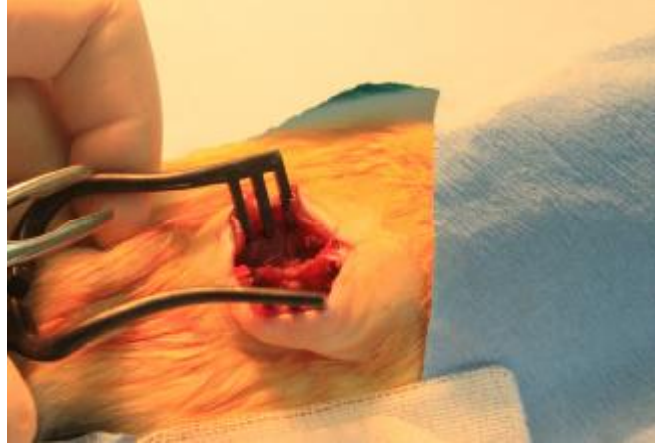
Resim 6: Cilt temizliğinden sonra, cerrahi sahanın steril cerrahi örtüyle örtülmesi

İnterskapuler mesafe referans alınarak prone pozisyonda L1-L5 seviyesinde orta hatta ortalama 4cm cilt insizyonu yapıldı (Resim 7).



Resim 7: Cilt insizyonu.

Cilt altı geçilip lomber fasya iki taraflı olarak açıldı. Küçük otomatik ekartör yerleştirildi (Resim 8).



Resim 8: Fasya diseksiyonu ve ekartasyon.

Paravertebral kaslar sıyrıldı. Sakrumdan sayılarak L3-L4 spinöz çıkıntılar bulundu ve eksize edildi. 1 mm genişliğindeki “Kerrison Rongeur” kullanılarak L3 ve L4 total laminektomi uygulandı. Ligamentum flavum ve epidural yağ dokusu kaldırıldı. Dura mater ortaya çıkarıldı (Resim 9).



Resim 9: Diseksiyon ve laminektomi sonrası ortaya çıkarılmış dura mater.

Hemostaz ve serum fizyolojik ile irrigasyon sonrası, deney grubuna göre materyaller uygulandı;

Birinci gruba cilt altı dokudan elde edilen serbest otojen yağ grefti konuldu (Resim 10).



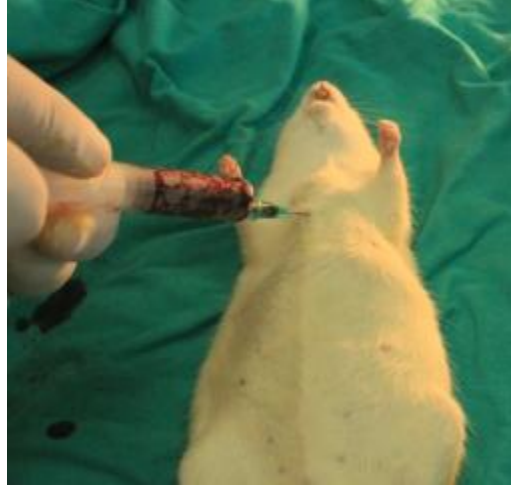
Resim 10: Serbest otojen yağ grefti uygulaması.

İkinci gruba eşit ölçülerde kesilmiş kollajen dural matriks uygulandı (Resim 11).



Resim 11: Laminektomi sahasına uygulanmış kollajen dural matriks.

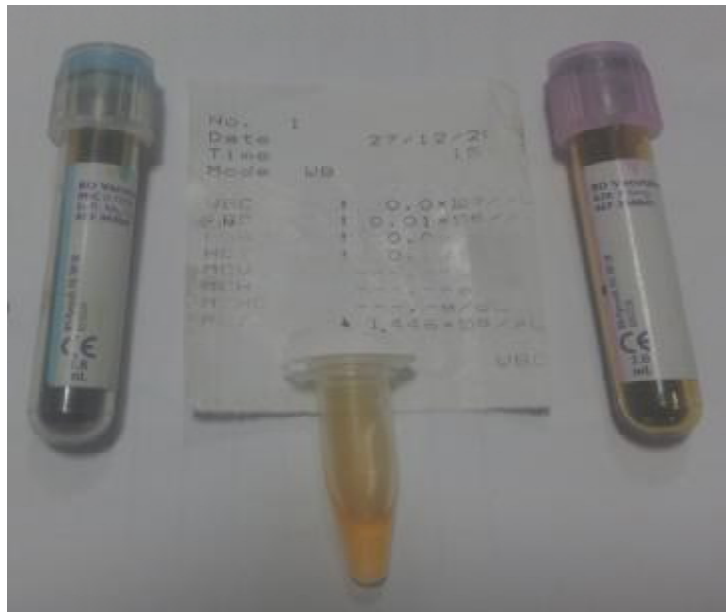
Üçüncü gruba ise gerekli laboratuvar aşamalarından geçip hazırlanan trombositten zengin plazma konuldu. TZP hazırlığı için öncelikle yedi adet rattan 24 G 10 cc'lik enjektör yardımı ile intrakardiyak kan alındı (Resim 12).



Resim 12: İntrakardiyak kan alımı.

Sitrat fosfonat dekstrozu (CPD) lu tüplere 10 cc, pediatrik EDTA' lı tüplere 0,5 cc kan kondu. EDTA' lı tüpe alınan kan, hücre sayımı için cihaza gönderildi. Tüplerdeki kanlar beş dakika süreyle ile çalkalandı. Sitratl tüpler TZP hazırlanması için Dokuz Eylül Üniversitesi Hematoloji Laboratuvarına soğuk zincirle nakledildi.

Laboratuvarında tüm işlemler steril koşullarda gerçekleştirildi. Soğutmalı santrifüjde (10 C°) önce 10 dakika 1500 devir/dakika'da santrifüje edildi. Üstte kalan plazma ve buffy-coat alınarak büyük ölçüde kan hücrelerinden ayrıldı. Daha sonra 2000 devir/dakika'da 10 dakika çevrildi. Üstte kalan trombositten fakir kısım ayrıldı. Ayrılan bu kısım ölçüm sırasında dilüe etmek amacıyla saklandı. Altta kalan bölüm tekrar 2500 devir/dakika'da çevrildi ve dipteki 1/3'lük kısımdan 1,5 cc TZP alındı. Jelatinöz bir kıvam elde etmek için mikropipet yardımı ile 0,30 cc % 10' luk CaCl_2 eklendi ve standart TZP olarak kabul edildi (44) (Resim 13).



Resim 13: TZP hazırlığı.

Her hazırlanan TZP'den 200 µl trombosit sayımı için alındı ve dört kat dilüe edilerek ölçüm yapıldı. Örnekler soğuk zincirle hayvan laboratuvarına nakledildi ve epidural TZP uygulamasında kullanıldı (Resim 14).



Resim 14: TZP'nin laminektomi sahasına uygulanışı.

Bu işlemler sonrasında tüm katlar anatomisine uygun kapatıldı. Fasya 5/0 poliglaktan, cilt 4/0 prolene ile dikildi. Denekler 28°C odada post operatif uyanma için bekletildi. Deneklere herhangi bir tespit uygulanmadı ve kafes içerisinde serbest hareketlerine izin verildi. İki gün arayla Povidone -iodine (Betadine®) ile pansuman yapıldı.

Denekler standart laboratuvar koşullarında (12 saat gündüz -12 saat gece olacak şekilde ışıklandırma, 20-22°C oda ısısı, % 50-60 nem) ve özel kafeslerde tutuldu. Yiyebilecekleri kadar su ve yiyecek verildi. Post operatif 24. saatte ve 48. saatte BBB skorlaması ile nörolojik değerlendirme tekrarlandı.

Her 3 gruptaki ratlara 4. hafta sonunda sakrifikasyon için Xysilazine HCL (Rompun®-Bayer İlaç San.) 5mg/kg, 35mg/kg intraperitoneal ketamin (Ketalar®-Eczacıbaşı İlaç San.) ile genel anestezi indüksiyonu yapıldı. Tam anestezi sağlandıktan sonra %7.5'lik 5 cc KCl (Basel® Kimya-İstanbul) 18 x 1.3 x 45 mm intravenöz katater iğnesi (Medflon®-Eastern Medikit Ltd-Hindistan) ile intrakardiyak uygulanarak sakrifikasyon gerçekleştirildi. Sakrifikasyon sonrası cilt insizyonu ve cilt altı diseksiyonu sonrası omurga çevresindeki lumbosakral fasya ile kaslar korunarak, laminektomi sahasının bir alt ve bir üst intervertebral disk aralığından 20 numara bistüri ile transvers olarak blok halinde çıkarıldı. Kraniale bir kaudale iki olmak üzere işaret dikişi konuldu (Resim 15).



Resim 15: Blok çıkarılmış lomber omurga kısmı

10 ml. izotonik NaCl solüsyonu ile yıkandıktan sonra formaldehit içerisinde histoloji laboratuvarına harflerle şifrelenerek teslim edildi (Resim 16).



Resim 16: Örneklerin harflerle adlandırılması

3.5 Histolojik İnceleme:

Histolojik incelemeler Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalında, gruplar hakkında daha önceden bilgilendirme yapılmamış tek bir uzman histolog tarafından yapıldı.

3.5.1 Rutin ışıık mikroskopik doku takibi protokolü

Deney sonunda elde edilen doku örnekleri %10'luk formaldehit ile 24-48 saat fiksasyon için bekletildi. Sonrasında 8 hafta kemik doku yumuşaması için EDTA'lı solüsyonda tutuldu. Doku takibi için fiksatif ajanın uzaklaştırılması amacıyla 1 gece akarsu altında yıkandı. Rutin doku takibindeki tüm işlemler 60°C etüvde gerçekleştirildi. Dehidratasyon amacıyla 20'ser dakika %70'den %95'e artan etil alkol serilerinden geçirildi.

Ardından 20’şer dakika 4 değişim aseton solüsyonlarından geçirilerek 2 değişim aseton solüsyonunda 30’ar dakika tutuldu. 60°C’lik etüv içerisinde 2 değişim parafin uygulanıp 1’er saat parafin ile immersiyonu sağlandı ve dokular parafin bloklar içerisinde gömüldü (Tablo 6). Parafin bloklardan inceleme yapmak amacıyla mikrotom aracılığı ile 5µm’lik kesitler alındı.

İşlem	Madde	Süre
Tespit	%10 formalin EDTA	24 saat-48 saat formalin 8 hafta EDTA
Fiksatifin uzaklaştırılması	Akar su	1 gece
Dehidratasyon	% 70, 80,95 etil alkol	20’şer dk
	Aseton (4 değişim)	20 dk
Şeffaflaştırma	Ksilol	30x2 dk
Emdirme %60 C etüv	Parafin	1x2 saat
Gömme	Parafin	

Tablo 6:Rutin ışık mikroskopik doku takibi protokolü

3.5.2 Hematoksilen-Eozin boyama metodu

Mikrotom aracılığı ile alınan 5µ’luk parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C’lik etüvde bırakıldıktan sonra, 20’şer dakika üç değişime ksilole tabi tutuldu. Ardından rehidratasyon için %95’den %70’e azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 10 dakika akarsu altında yıkandı. 10 dakika hematoksilen ile boyamanın ardından boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler 2 dakika eozin boyası ile boyandı. Ardından sırasıyla %80 ve %95’lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30’ar dakika iki değişim de tutulduktan sonra entellan ile kapatıldı (Tablo 7) .

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilol (3 değişim)	20 dk
Rehidratasyon	% 95 alkol	Yıkama
	% 80 alkol	Yıkama
	% 70 alkol	Yıkama
Yıkama	Akar su	10 dk
Boyama	Hematoksilen	10 dk
Yıkama	Akar su	10 dk
Boyama	Eosin	2 dk
Yıkama	Akar su	5 dk
	% 80 alkol	1 yıkama
	% 95 alkol	1 yıkama
Şeffaflaştırma	Ksilol (3 değişim)	20 dk
Kapama	Entellan	

Tablo 7: Hematoksilen-Eozin boyama metodu.

Epidural fibrozisin derecelendirilmesinde He ve arkadaşlarının (45) yöntemi kullanıldı (Tablo 8).

0. evre	Duramaterde skar dokusu yok.
1. evre	Duramater ve skar dokusu arasında sadece ince fibröz bantlar mevcut.
2. evre	Laminektomi defekti alanının 2/3 ünden az alanda yapışıklık var.
3. evre	Laminektomi defekti alanının 2/3 ünden fazla alanda, ve/veya sinir köklerine uzanan yapışıklık şeklinde değerlendirildi.

Tablo 8: Histolojik fibrozis evreleme skalası

Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu (Olympus BX 50) ile incelenerek fotoğraflandı. Ardından epidural mesafedeki fibrozis evrelemesi kayıt edildi.

4.BULGULAR

4.1. Deneklerin klinik değerlendirme sonuçları

Post operatif 24. saatte ve 48. saatte BBB skorlaması ile nörolojik değerlendirme verileri kaydedildi (Tablo 9 ve Tablo 10). Çalışma sresinde tüm denekler canlı kaldı. Hiçbir denekte enfeksiyon gelişmedi.

rnek No	Yağ	Kollajen matrix	TZP
1	7	6	7
2	7	7	7
3	7	7	7
4	7	7	6
5	6	7	7
6	7	7	7
7	7	7	7

Tablo 9: 24.saat erken nörolojik skorlama (arka ekstremitte hareketleri).

rnek No	Yağ	Kollajen matrix	TZP
1	20	21	21
2	21	21	21
3	21	20	21
4	21	21	20
5	21	21	21
6	21	21	21
7	21	21	21

Tablo 10: 48. Saat geç nörolojik skorlama.

4.2 Deneklerin histolojik değerlendirme sonuçları

Deneklerin laminektomi seviyesinden geçen aksiyel kesitleri histolojik olarak incelendi. Örneklerde herhangi bir allerjik, enfeksiyon ve yabancı cisim reaksiyonu bulgusuna rastlanılmadı.

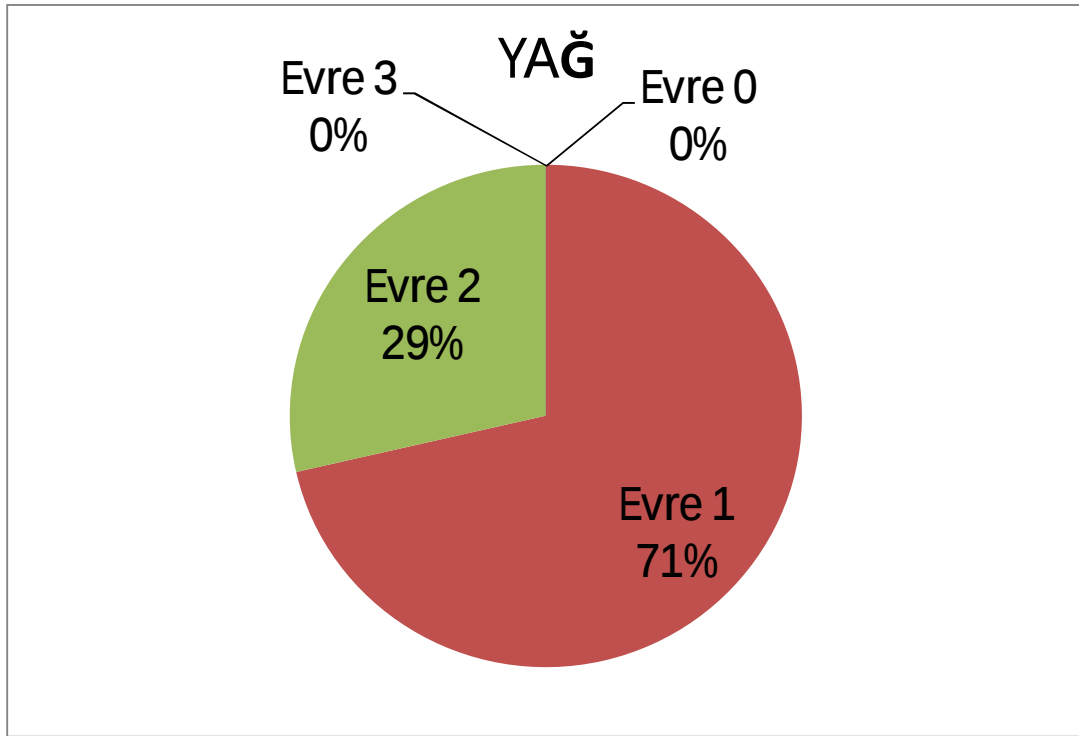
Histolojik incelemede epidural mesafede saptanan fibrozisin He ve arkadaşlarının (45) tanımladığı yönteme göre derecelendirmesi Tablo 11 'de gösterilmektedir.

DENEK	YAĞ	KOLLAJEN MATRİX	TZP
1	1	2	1
2	1	3	2
3	1	3	1
4	1	1	1
5	2	1	1
6	1	3	0
7	2	2	1

Tablo 11: Histolojik incelemelerin non-parametrik değerlendirilmesinin sonuçları.

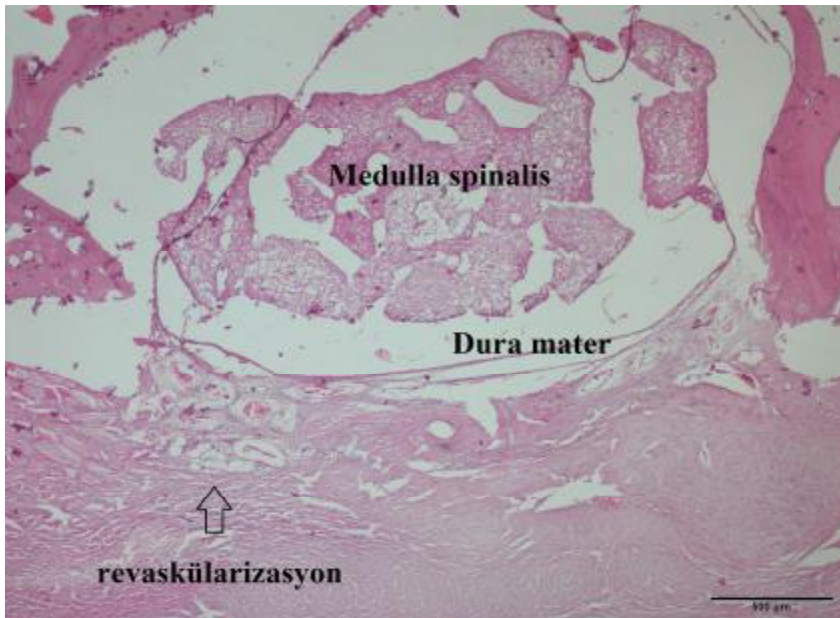
Elde edilen histolojik görüntüler 10X ve 20X büyütmelerde değerlendirilerek fotoğraflanmıştır. Kesit incelemelerinde hücresel birikim, skar dokusu ve özellikleri, fibroblastik aktivite ve fibrotik doku gelişimi incelenmiştir.

Birinci grupta serbest yağ yastıkğı uygulanmış laminektomi alanları incelendiğinde, örneklerin büyük çoğunluğunda 1. evre fibrozis (%71) olduğu dikkati çekmiştir. Geri kalan iki örnekte de 2. evre fibrozis (%29) saptanmıştır. Bu grupta 3. evre bulguları gözlenmemiştir (şekil 2).



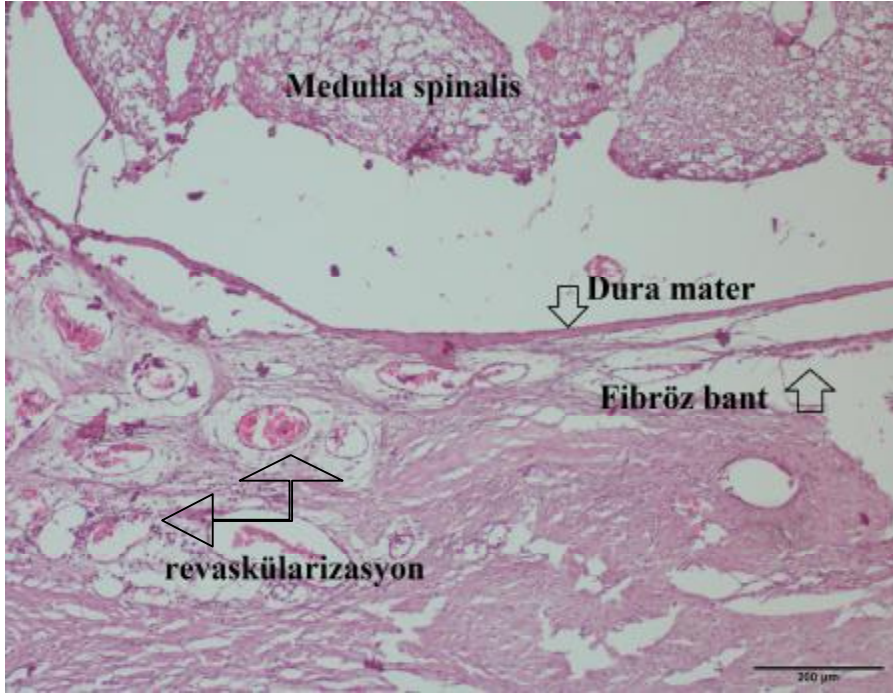
Şekil 2: Serbest otojen yağ grefti grubu histolojik verilerin grafiksel dağılımı

Bu gruptaki örneklerden 10X büyütme incelemesinde, laminektomi sahasından geçen histolojik kesitte medulla spinalis ve duramater üzerinde yoğun revaskülarizasyon alanları görülmüştür. İncelenen kesitlerden bir örnek Resim 17’de verilmektedir.



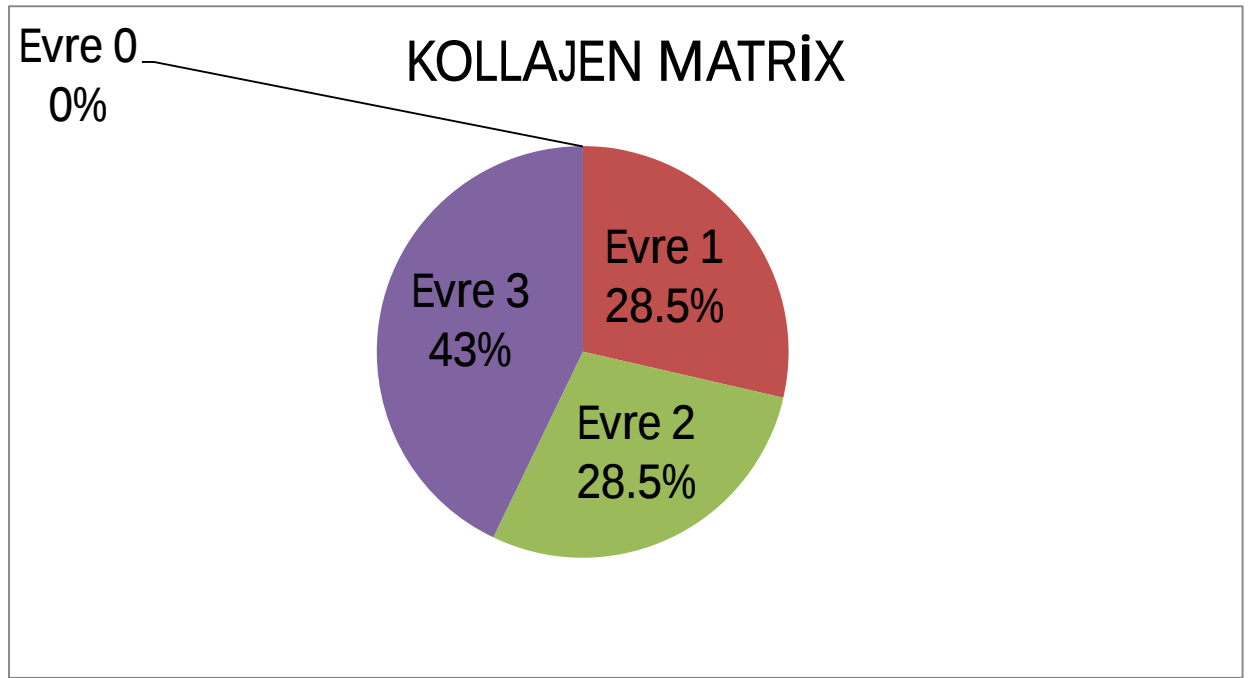
Resim 17: Serbest yağ yastıkçığı uygulanmış olan örnekte dura materin hemen üzerinde yoğun revaskülarizasyon alanları görülmektedir (10X büyütme).

Serbest otojen yağ grefti uygulanan örneklerin daha büyük büyütmedeki (20X) görüntüsünde, revaskülarizasyon alanlarının yanında ince fibröz bant şeklinde evre 1 fibrozis görüntülerine de rastlanmıştır (Resim 18). İki örnekte ek olarak kesitin 2/3' ünden az olacak şekilde fibrotik genişlemeler saptanmıştır.



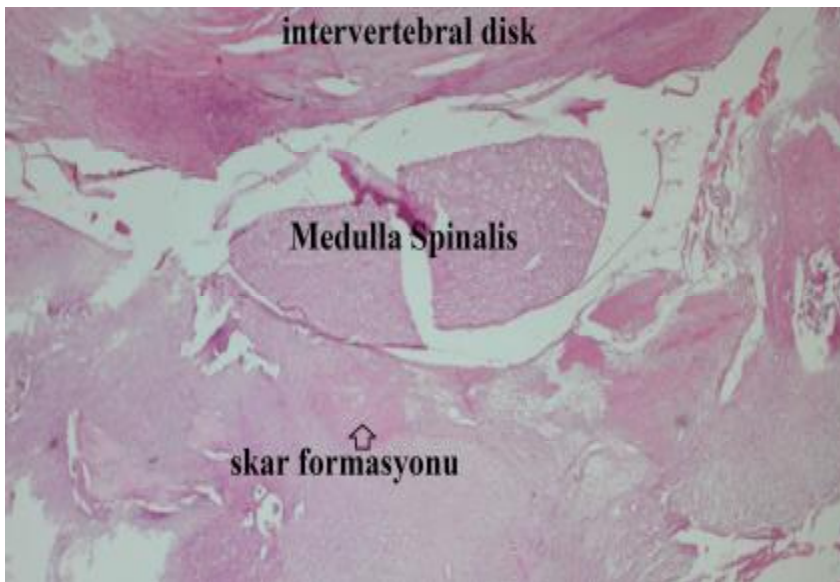
Resim 18: Serbest yağ yastıkçığı uygulanmış bir örneğin histolojik kesitinde dura mater ile üzerindeki revaskülarizasyon alanları arasında evre 1 olarak değerlendirilebilecek olan fibröz bant seçilmektedir (20X büyütme).

İkinci grupta kollajen dural matriks uygulanmış örneklerin histolojik kesitlerinde, ikişer örnekte evre 1 ve evre 2 fibrozis (%28.5 eşit oranlarıyla) saptandı. Geri kalan üç örnekte kesit alanının 2/3' ünden fazla olan ve görüntülenebilen sinir köklerine kadar uzanan fibrotik skar dokuları izlenmiştir. Bu üç olgunun fibrozis evrelemesi, evre 3 (%43) olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3).



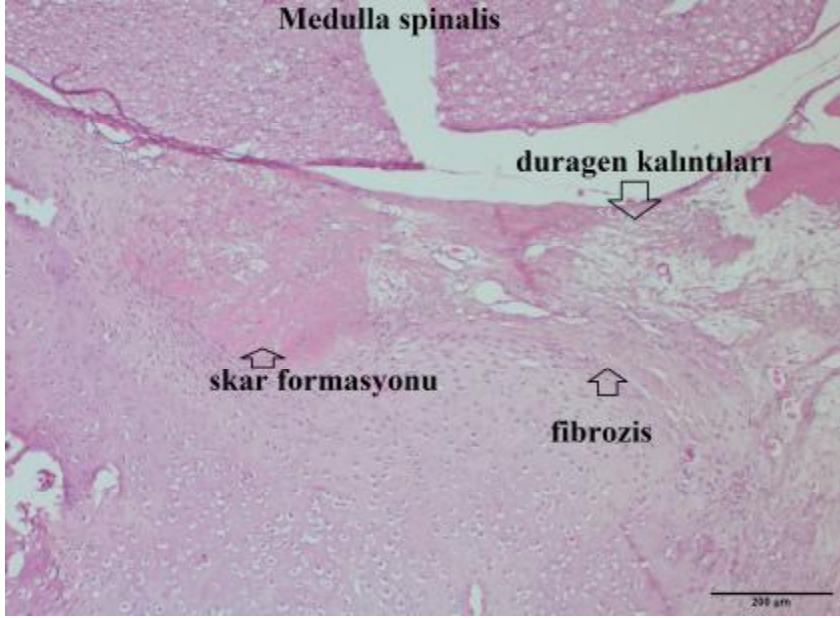
Şekil 3: Kollajen dural matriks grubu histolojik verilerin grafiksel dağılımı

Bu grupta diğer gruplardan farklı olarak yoğun fibröz doku ve bol miktarda fibroblastlar gözlemlendi. Bazı örneklerde fibröz dokunun yoğun olduğu ve skar dokusu gelişiminin belirginleştiği izlendi. Diğer gruplarda skar dokusu gelişimine uyan histolojik bulgulara rastlanmadı (Resim 19).



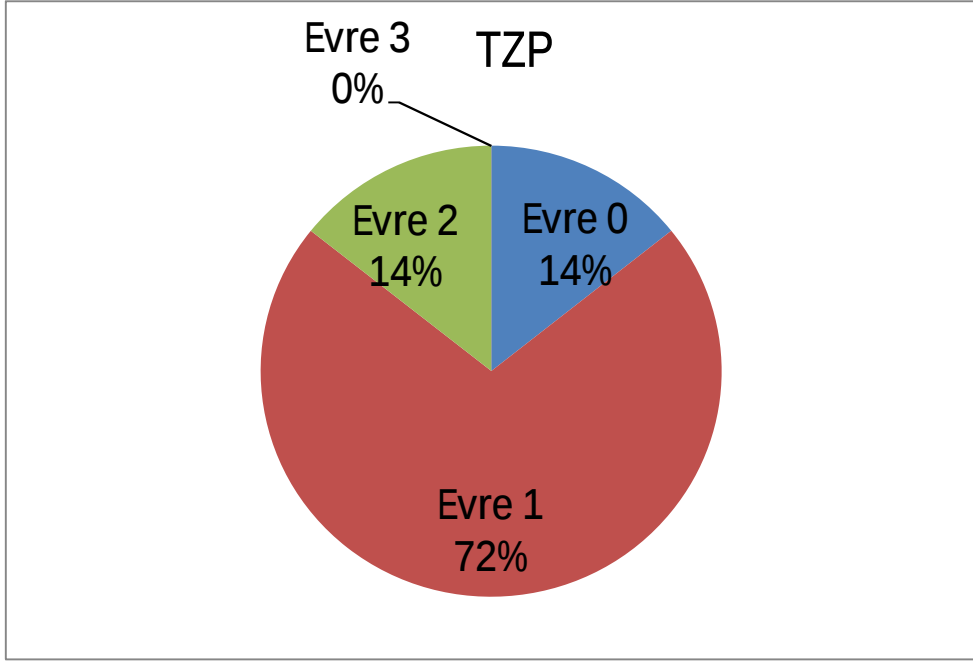
Resim 19: Kollajen dural matriks uygulanan örnekte skar dokusu gelişimi (10X büyütme).

Daha büyük büyütmede (20X) ise laminektomi sahasından geçen histolojik kesitte kollajen dural matriks kalıntıları da görülmüştür. Yoğun fibröz doku, epidural mesafenin 2/3'ünden fazlasını çevrelemektedir (Resim 20).



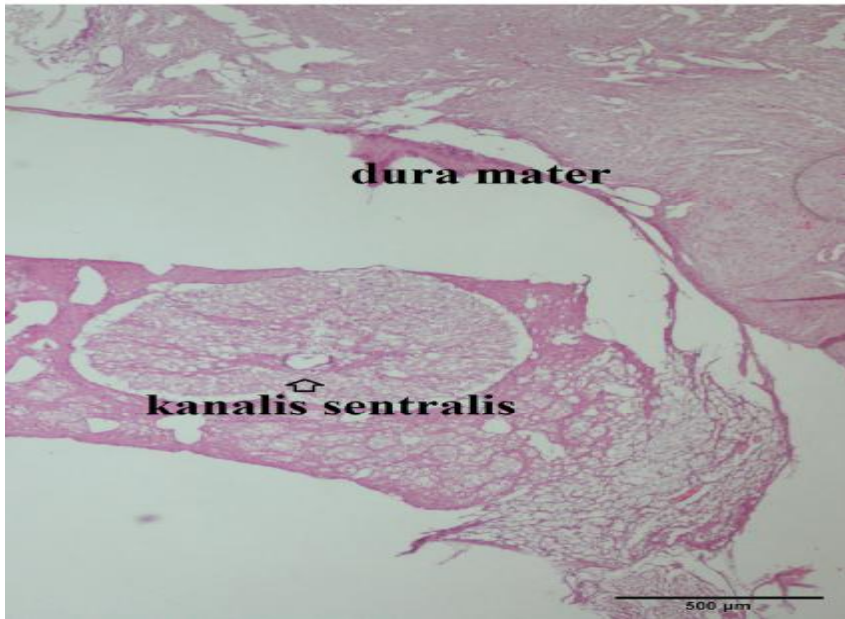
Resim 20: Kollajen dural matriks uygulanan örneğin daha büyük büyütme görüntülerinde skar ve fibrozis dokusu (20X büyütme).

Üçüncü grubun fibrozis evrelemesi değerlendirildiğinde diğer gruplardan farklı olarak bir örnekte hiçbir fibroblastik aktivite saptanmamıştır. Evre 0 (%14) olarak kabul edilen bu örnek yanında hiçbir örnekte evre 3 fibrozis gözlenmemiştir. İncelenen örneklerin çoğunda evre 1 fibrozis (%72) bulguları izlenmiştir (Şekil 4).



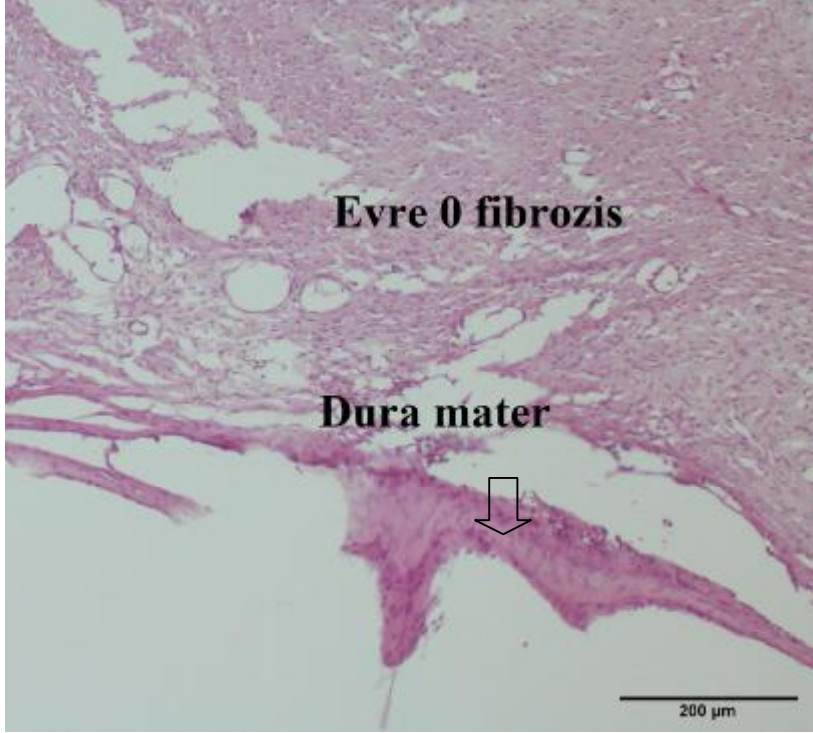
Şekil 4: TZP grubu histolojik verilerin grafiksel dağılımı

TZP uygulanan örnekten alınan kesitte epidural bölgede fibroblastların oldukça nadir görüldüğü dikkati çekmektedir. Epidural dokuda histolojik olarak fibröz doku çok az olup cerrahi uygulanmamış doku özelliklerine yakın hücresel özellikler görülmüştür. Epidural dokudaki iyileşme bulguları klasik tanımlamalara yakın olarak gözlenmiştir (Resim 21).



Resim 21: TZP uygulanan gruptan bir örnek (10X büyütme)

TZP uygulanan gruptan alınan örneğin daha büyük görüntülemesinde (20X), serbest otojen yağ yastıkçığı uygulanan grupta gözlenen revaskülarizasyon alanlarına rastlanmamıştır. Doku içindeki kollajen liflerinin gözlemsel olarak daha fazla olduğu görülmüş ancak kollajen boyaması ve evrelendirmesi yapılmadığından veriler sayısal olarak değerlendirilememektedir. Fibrozis seviyesi evre 0 olarak belirlenen bir örnek Resim 22’de gösterilmektedir.



Resim 22: TZP uygulanan gruptan evre 0 fibrozis saptanan bir örnek (20X büyütme).

4.3 İstatistik değerlendirme sonuçları

Çalışma gruplarının yapısı ve çalışmanın tasarımı göz önüne alındığında istatistiksel değerlendirme için üç grubun birbiri ile karşılaştırılması için Kruskal Wallis varyans analizi testi, grupların kendi içlerinde ikili karşılaştırmaları için ise Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanıldı.

Üç deney grubunun histolojik fibrozis evreleme verilerinin birbirleri ile karşılaştırması Kruskal Wallis testi ile yapıldı. Üç deney grubunun histolojik sonuçlarının dağılımlarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$) (Tablo 12).

Test istatistikleri	Epidural fibrozis
Chi-Square	6,794
P değeri	0,033

Tablo 12: Kruskal Wallis testi ile üç grup karşılaştırmasının istatistik sonuçları

Grupların ikili karşılaştırmasında ise kollajen dural matriks uygulanan grupla TZP uygulanan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Kollajen dural matriks grubu ile serbest otojen yağ yastıkçığı uygulanan grup arasında anlamlı fark bulunmamaktadır ($p > 0.05$). TZP ile serbest otojen yağ yastıkçığı karşılaştırmaları arasında da istatistiksel anlamlı farklılık yoktur ($p > 0.05$) (Tablo 14).

Gruplar	P değerleri
Yağ - Kollajen dural matriks	0.097
Kollajen dural matriks- TZP	0.038
Yağ-TZP	0.456

Tablo 13: Mann-Whitney U testi ile grupların ikili karşılaştırmaları.

Deneklerin preoperatif ve postoperatif nörolojik muayene veri karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 14).

Gruplar (Yağ, Kollajen matrix, TZP)	24.SAAT	48.SAAT
P değeri	0.467	0.467

Tablo 14: Kruskal Wallis testine göre her üç grubun 24.saat ve 48.saat nörolojik bulgularının değerlendirilmesi

5.TARTISMA

Herhangi bir nedenle posterior omurga cerrahisi geçirmiş hastalarda tüm tedavi modaliteleri uygulanmasına rağmen epidural fibrozis gelişebilmektedir. Buna bağlı postoperatif bel ve/veya bacak ağrıları sürebilmektedir. Epidural fibrozis dura mater, sinir köklerine, erektör spina kaslarına, intervertebral disk ve vertebra cisminde yapışarak klinik tabloyu oluşturabilir.

Fibrozis, sinir kökünde çekilme, gerilme veya baskı oluşturarak radiküler ağrı oluşturur. Özellikle ileri postoperatif dönemde ağrı, duyu ve motor nörolojik defisitler ortaya çıkabilir. Lomber spinal cerrahi sonrası geçmeyen bel ağrısının en önemli etkenlerinden biri olarak görülen epidural fibrozisin önlenmesi amacı ile birçok biyolojik ve biyolojik olmayan materyal denenmiştir (4,17). Serbest otojen yağ grefti, pediküllü yağ greftleri, amniyotik membran, kollajen matriks (DuraGen™), Politetrafloroetilen (Gore-tex™), Seprafilm™, Adcon-L™, mitomisin-C, sodyum hiyaluronik asit, aprotinin, 5-Florourasil, oktreotid, karboksi metil selüloz, temozolamid, non-steroid anti-inflamatuar ajanlar, alfa lipoik asit, bal, düşük doz metilen mavisi, melatonin, oktreotid, düşük doz radyasyon, interferon gama, çitin, sitikolin, deksametazon, karbonhidrat polimer, takrolimus, omentum, atrisorb vs. öne çıkan deney materyalleridir. Bunların bir kısmı klinik kullanımda yer bulmuştur. Çalışmaların büyük kısmı hayvan deneyleri şeklinde sürdürülmekle beraber, günümüzde henüz klinik uygulamada bu materyallerin fibrozisi azalttığı yönünde yeterli klinik çalışma gerçekleştirilmemiştir.

Çalışmamızda kullanılan deney materyalleri ise kollajen dural matriks, yağ ve TZP olup üçü de biyolojik kökenlidir. Bu üç deney materyalinin üç ayrı grupta kullanıldığı çalışmamızda laminektomi alanlarında histolojik veriler istatistikinde anlamlı fark bulunmaktadır. İkili karşılaştırmalarda ise kollajen matriks uygulanan gruba TZP uygulanan grup arasında anlamlı fark bulunmuştur. Epidural fibrozis, TZP uygulanan grupta kollajen dural matriks uygulanan gruba göre daha az bulunmuştur.

Bu materyaller arasında epidural fibrozisin önlenmesinde yağ greftleri uygulamaları, deney modellemelerinde sık tercih edilmiştir. Bryant ve ark. 44 hastalık serbest otojen yağ grefti kullanımı sonuçlarını içeren çalışmada, otojen yağ grefti uygulamasının yara iyileşmesi sırasında revaskülarizasyonu arttırdığını ve böylece fibrotik dokunun engellendiğini bildirmişlerdir (46). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde uygulanan yağ grefti alanlarında revaskülarizasyon oluşumu fark edilmekte, fibrotik doku oluşumunun azaldığı histolojik olarak gözlenmektedir. Ancak yağ uygulamasının vaskülarizasyondaki

artışa katkısı, nedeni ve oluşan vaskülarizasyonun fibrotik doku azalmasıdaki etki mekanizması üzerine yorum yapabilecek bir veri elde edilememiştir.

Klinik bir çalışma olmakla birlikte; Görgülü ve ark. yaptığı lomber disk hernisi tanısıyla opere edilen 99 hastayı içeren klinik bir çalışmada ise yağ greftlerinin klinik olarak etkisiz olduğu bildirilmiştir (47). Bununla birlikte Prusick ve ark. iki hastada yağ greftinin spinal kanal içine kayması sonucu kauda ekina sendromu geliştiğini bildirmişlerdir (48). Çalışmamızda herhangi bir denekte bu ve benzeri nörolojik komplikasyona rastlanmamıştır. Ancak denek hayvanlarının küçük olması, spinal kanalın dar olması ve denek sayısının azlığı nörolojik komplikasyonumuzun olmamasında yanıltıcı etkenler olabilirler.

Kuivila ve ark. laminektomi modelinde yağ greftiyle heparinize materyali karşılaştırmışlardır. Sonuçta heparinize materyalin etkin olmayıp yağ greftlerinin ise etkin bulunduğunu bildirmişlerdir (49). Gill ve ark. ise 107 köpek üzerinde yaptıkları deneylerde pediküllü yağ greftinin lomber spinal cerrahide kullanılan gelfoam, gelfilm, polietilen ve silastik materyallere karşı üstün olduğunu söylemektedirler (50). Bizim çalışmamızda farklı olarak serbest yağ materyali tercih edilmiştir. Rat modelinde omurgaya pediküllü yağ flebi uygulaması teknik olarak pek mümkün görünmemektedir. Sonuçlarımız gözden geçirildiğinde serbest yağ materyalinin, spinal cerrahide sık kullanılan adhezyon önleyici bariyer olan kollajen dural matrikse nazaran, istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da histolojik verilerin gözlemsel karşılaştırmasında daha iyi sonuçlar verdiği düşünülmüştür. Serbest otojen yağ grefti uygulanan grupta epidural bölgede evre 3 skar formasyonu oluşmamış olması, evre 3 skar oluşan kollajen dural matrikse göre daha olumlu bir sonuç elde edilebileceğini düşündürülebilir. Bu gözlemlerin istatistiksel olarak karşılık bulmamış olması, örnek sayısının ve fibrozis sınıflamasındaki evrelendirme basamaklarının az olmasından kaynaklanabilir. Otojen yağ grefti uygulanan örneklerdeki fibrozis düzeyi TZP uygulanmış grupla karşılaştırıldığında, veri ortalamalarının birbirine yakın olduğu gözlenmektedir. Özetle serbest yağ greftinin fibrozis üzerindeki etkisinin TZP uygulamasına yakın olduğu düşünülebilir.

Travma ya da cerrahi sonrası doku iyileşmesinin beklendiği alanlarda kullanımı popüler bir materyal olan TZP, günümüzde birçok çalışmaya konu olmaktadır. İngilizce literatür taramalarında TZP'nin epidural fibrozis üzerine etkisi başlığıyla herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bununla birlikte omurga cerrahisinde TZP kullanımına yönelik az sayıda çalışma bulunmaktadır. Gigante ve ark. yaptıkları çalışmada, ratlarda paravertebral kas lezyonlarında TZP uygulanması sonrası iyileşmede metaplazi, kalsifikasyon ve heterotopik ossifikasyon gözlemlenmemişlerdir (36). Bizim çalışmamızda da TZP'nin uygulandığı

deneklerde, benzer anormal hücresel formasyonlara rastlanmamıştır. Bu örneklerde evre 2 üzerinde fibrozis oluşumlarına da rastlanmamıştır.

Obata ve ark. çalışmalarında, tavşanlarda disk dejenerasyon modeli sonrası TZP uygulamasında disk rejenerasyonunda olumlu etki saptamışlar, nukleus pulposus hücrelerinde kollajen matriks ve tip 2 kollajen oranında artış gözlemişlerdir (31). Her ne kadar çalışma alanlarımız farklı olsa da laminektomi alanlarımızda benzer şekilde kollajen artışı saptanmış ama çalışma tasarımında kollajen değerlendirmesi planlanmadığından sadece subjektif bir gözlem olarak kabul edilmiştir.

Literatürde TZP'nin, zedelenme sonrası ortama ulaşan trombosit alfa granüllerinin lizise uğraması, böylece ortama büyüme faktörleri salınımı ile yeniden şekillenme olaylarının hızlandırılması sonucu doku iyileşmesini fibrozis gelişmeden sağlayabileceği bildirilmektedir (32, 33, 34, 35). Birçok dokuda iyileşmeyi hızlandırdığı ve fibrozisi azalttığı öngörölmüş ve bildirilmiş olan TZP'nin, bizim çalışmamızda epidural fibrozis üzerine etkileri araştırılmıştır. Histolojik bakılarda fibrozis skorlarının diğer gruplara nazaran düşük olması hipotezimizi doğrular niteliktedir. TZP uygulanan tüm deneklerde evre 3 fibrozisin hiç olmaması bu lehte bir veri olmakla birlikte, istatistiksel karşılaştırmada kollajen dural matriks grubuna göre anlamlı farklılık bulunmuştur. Ayrıca otojen veya allojen kandan elde edilen TZP' nin üretim maliyeti de çok düşüktür.

Adhezyon önleyici materyaller arasında sayılan dural greftlere ilgi post travmatik epilepsiler sonrası ortaya çıkan meningoserebral adhezyonlar ve beyinde skar formasyonu oluşumunu geriletmek üzerine başlamıştır. Buradan esinlenen ve süregelen çalışmalarda kollajen dural matriks epidural fibrozis gelişimini azaltır hipotezi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Tatsui ve ark. yaptığı tavşan deneyinde laminektomi sahalarına 1. grupta serbest otojen yağ grefti, 2. grupta DuraGen uygulamış, 3. grupta ise kontrol grubu olarak hiçbir materyal uygulamamışlardır. DuraGen uygulanan grup yağ uygulanan gruba göre MRG ve histolojik bakılarda daha üstün bulunmuş ancak kontrol grubuyla istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (27). Bu çalışma ile bizim sonuçlarımız arasında önemli benzerlikler bulunmakla birlikte denek gruplarımızın bir tanesinde TZP kullanılması bizim çalışmamızın en önemli farklılığıdır. Sonuçlarımız karşılaştırıldığında, Tatsui ve arkadaşlarının öne sürdüklerinin aksine istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmasa da histolojik kesitlerdeki gözlemsel veriler yağ greftinin kollajen dural matrikse göre daha olumlu hücresel reaksiyonlara neden olduğunu göstermektedir.

Her ne kadar bazı makalelerde epidural fibrozis cerrahisinde fibrotik doku ile nöral yapılar arasında bariyer olarak kollajen dural matriks kullanılması önerilse de (27), çalışmamızdaki histolojik fibrozis verileri ve kesitlerde kollajen dural matriks kalıntıları ile birlikte yoğun fibroblastik aktivite bulguları göz önüne alındığında kollajen dural matriks kullanımı soru işaretleri yaratmıştır.

Tüm bu epidural fibrozis azaltma amaçlı uygulamaların yanı sıra, standart cerrahi uygulamaların epidural fibrozis gelişimi üzerine katkısını göz ardı etmemek gerekir. Bu düşünceyle çalışmamızda cerrahi işlemler aynı düzen içerisinde ve tek cerrah tarafından uygulanmıştır. Cerrahi alan mümkün olan en küçük boyutta tutulmaya çalışılmıştır. Potansiyel ölü boşluğun büyüklüğü cerrahi kapamanın sıkı yapılmasıyla azaltılmaya çalışılmıştır. Kemaloğlu ve ark. epidural fibrozisin önlenmesinde en önemli koruyucu faktörün cerrahi girişim sahasındaki lokal hematoma önlenmesi olduğunu söylemişler (51). Bizim çalışmamızda hiçbir örnekte önemli bir kanama ve hematoma gelişimi saptanmamıştır. Cerrahi uygulama sırasında diseksiyona özen gösterilmiş ve olabildiğince subperiosteal çalışılmıştır. Gruplar arasında standardizasyonun bozulmaması için tüm örneklerde aynı kalınlıkta, özellikte ve markada dikiş materyalleri kullanıldı. Tüm örneklerin yara yerleri eşit miktarda ve özellikte yıkama solüsyonları ile yıkandı. Histolojik değerlendirmeler de tek bir histolog tarafından yapıldı.

Çalışmamızın bazı zayıf yanları da vardır. Öncelikle denek sayımız azdır. Deney hayvanı bulmaktaki güçlükler nedeniyle nonparametrik istatistik testlerine göre en düşük sayıda deney hayvanı elde edilebildi. Denek sayısındaki azlık bazı oransal ve rakamsal değerlerin geçerliliğinin az olmasına neden olabilir. Ancak denek sayısı az olsa bile TZP grubunda kollajen dural matriks grubuna göre belirgin olarak fibroblastik aktivitenin az olması dikkat çekici ve anlamlıdır. Örneklerin rat gibi küçük hayvanlardan seçilmiş olması da dezavantaj gibi görünebilir. Tabii ki daha büyük hayvanlarda çalışılması gerek cerrahi teknik gerekse histolojik hazırlıklar açısından daha kolay olacaktır. Ancak çalışma ekibinin küçük deney hayvanları üzerindeki deneyimi yeterli olarak düşünülmüştür.

Çalışmadaki bir diğer zayıf yön histolojik evrelendirme basamaklarıdır. Fibrozis evrelendirmesi sadece dört basamak olarak yapılmaktadır. Böylece spesifitesi az olmaktadır. Bu soruna denek sayısının da azlığı eklendiğinde istatistiksel çalışmalar gözlemsel verileri tam olarak yansıtamamaktadırlar. Kollajen dural matriks grubunda bazı örneklerin histolojik kesitlerinde yabancı cisim kalıntıları saptanmış ancak bunlar yabancı cisim olmayan örneklerden farklı bir gruba alınamamıştır. Bu nedenle daha ayrıntılı histolojik fibrozis sınıflandırma sistemlerine gereksinim vardır. Elektron mikroskopik çalışmalar bu konuda yeni ufuklar açabilir.

6. SONUC

Çalışmamızda omurga cerrahisinde sıkça kullanılan iki materyal ile TZP' nin, önemli bir klinik sorun olan epidural fibrozis gelişimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Literatürde epidural serbest yağ uygulaması ve kollajen matriks uygulamalarının olumlu ve olumsuz sonuçlarını bildiren çalışmalar nedeniyle ortak bir görüş birliği yoktur. Bununla birlikte çalışmamız TZP'nin epidural fibrozis üzerine etkilerini araştırarak ilk çalışmadır. TZP, hastanın kendi kanından ve kolay elde edilebilen, üretim maliyeti oldukça düşük bir materyal olup, doku iyileşmesindeki ve fibroblastik aktiviteyi azaltmadaki etkileri daha önceki çalışmalarla vurgulanmıştır.

Çalışmamızın sonuçları yorumlandığında, TZP uygulanan örneklerde epidural fibrozisin yağ uygulamasına benzer sonuçlar verdiği ancak kollajen matriksten çok daha az fibrozis gözlendiği saptanmıştır. Bu nedenle epidural fibrozisin önlenmesi için laminektomi uygulanan hastalarda TZP kullanımının kollajen matrikse göre daha az fibrozise yol açabileceği söylenebilir. Ancak denek sayısının azlığı ve histolojik evrelendirmelerin dar kapsamlı olması nedeniyle geniş serili ve kapsamlı çalışmalara gereksinim vardır.

7. KAYNAKLAR

- 1- Steven JA, Richard AD. Evaluating and Managing Acute Low Back Pain in the Primary Care Setting J Gen Intern Med. 2001 February; 16 (2) ; 120–131.
- 2- Fyrmoyer JW, Cats-Baril WL. An overview of the incidences and costs of low back pain. Orthopedic Clinics of North America 1991; 22; 2: 263-270.
- 3- Battie MC, Bigos SJ. Industrial back pain complaints: a broader perspective. Orthopedic Clinics of North America 1991; 22;2: 273-282.
- 4- Burton CV, Kirkaldy-Willis WH, Young-Hing K, Heithoff KB. Causes of failure of surgery on lumbar spine. Clin Orthop Relat Res 1981; 157:191-199.
- 5- Soames RW. Skeletal system. Gray's Anatomy, Williams PL (ed), Thirty-Eighth Edition, Churchill-Livingstone,1995; 425-736.
- 6- Snell RS. Sırt anatomisi. Klinik anatomi. Türkçe çeviri editörü Yıldırım M. 5.baskı 1995; 824-838.
- 7- Dong Sun Shin,Min Suk Chung, Jin Seo Park, et al. Three-dimensional surface models of detailed lumbosacral structures reconstructed from the Visible Korean. Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger Volume 193, Issue 1, 20 February 2011; Pages 64–70.
- 8- Mitchell RN, Cotran RS. Akut ve kronik inflamasyon. Temel Patoloji. Türkçe çeviri Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 6. Baskı 2000; 25-46.
- 9- Mitchell RN, Cotran RS. Onarım. Hücre rejenerasyonu, fibrozis, ve yara iyileşmesi. Temel Patoloji. Türkçe çeviri Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 6. Baskı 2000; 47-59.
- 10-Guyton AC. Dolasım sistemi. Tıbbi Fizyoloji 3. Baskı Nobel Tıp Kitapevi 1989; 301-313.
- 11- Lubina ZI, Baranovic S, Karlak I, Novacic K, Potocki-Karacic T, Lovric D. The grading model for the assessment of the total amount of epidural fibrosis in postoperative lumbar spine. Eur Spine J. 2013 Apr; 22(4):892-7.
- 12- Barbera J, Gonzales J, Esquerdo J, Broseta J, Barcai-Salorio JL. Prophylaxis of the laminectomy membrane. An experimental study in dogs. J Neurosurg. 1978; 49: 419-24.
- 13- Martin-Ferrer S. Failure of autologous fat grafts to prevent postoperative epidural fibrosis in surgery of the lumbar spine. Neurosurgery 1989; 24: 718-21.

- 14- Brodsky AE. Post- laminectomy and post-fusion stenosis of the lumbar spine. Clin Ortho Rel Res 1976; 115:130-8.
- 15- Annertz M, Jonsson B, Stromqvist B, Holtas S. No relationship between fibrosis and sciatica in the lumbar postdiscectomy syndrome. A study with contrast-enhanced magnetic resonance imaging in symptomatic and asymptomatic patients. Spine 1995; 20(4): 449-53.
- 16- Ross JS, Robertson JT, Fredericson RCA, et al. Association between peridural scar and recurrent radicular pain after lumbar discectomy. Magnetic resonance evaluation. Neurosurgery 1996; 38(4):855-61.
- 17- Braverman DL, Slipman CW, Lenrow DA. Using gabapentin to treat failed back surgery syndrome caused by epidural fibrosis: a report of 2 cases. Arch Phys Med Rehabil 2001; 82: 691-3.
- 18-La Rocca H, Mancab I. The laminectomy membrane.Studies in its evolution,carachteristics, effects and prophylaxis in dogs. The Journal of Bone and Joint Surgery 1974 ; 56B:545-550.
- 19- Kahanovitz N, Viola K, Muculloch J. Limited surgical discectomy and microdiscectomy. Spine 1989; 14: 79-81.
- 20- Nussbaum CE, McDonald JV, Baggs RB. Use of vicryl Polyglactin 910 mesh to limit epidural scar formation after laminectomy, Neurosurgery 26(4) 1990; 649-654.
- 21-Aydıncak O, Yılmaz MB, Emmez H, et al. The Effect of Temozolomide on the Prevention of Epidural Fibrosis Developing after Lumbar Laminectomy in RatsTurkish Neurosurgery 2012; Vol: 22, No: 6, 706-711.
- 22- Çelik B, Çağlar N. Başarısız Bel Cerrahisi Sendromu: Nedenleri, Tanı ve Tedavi. Türk Fiz Tıp Rehab Derg 2007; 53: 30-4.
- 23- Shofferman J, Reynolds J, Herzog R, Covington E, Dreyfuss P, O'Neill C. Failed back surgery. Etiology and diagnostic evaluation. Spine 2003; 3: 400-3.
- 24- Narotam PK, van Dellen JR, Bhoola KD, et al. A clinicopathological study of collagen sponge as a dural graft in neurosurgery. J. Neurosurg. Vol 82, 1995; 406-12.
- 25- Zerris VA, James KS, Roberts JB, Bell E, Heilman CB. Repair of the dura mater with processed collagen devices.J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2007 Nov; 83(2):580-8.

- 26-Neulen A, Gutenberg A, Takacs I, Weber I, et al. Evaluation of efficacy and biocompatibility of a novelsemisynthetic collagen matrix as a dural onlay graftin a large animal model. *Acta Neurochir (Wien)* 2011 Nov; 153(11): 2241-50.
- 27-Tatsui CE, Martinez G, Li X, Pattany P, Levi AD. Evaluation of DuraGen in preventing peridural fibrosis in rabbits. Invited submission from the Joint Section Meeting on Disorders of the Spine and Peripheral Nerves. *J Neurosurg Spine* 2006 Jan 4(1); 51-9.
- 28-Collajen dural matrix broshcure <http://www.integralife.com/products%2Fpdfs%2F418DuraGen%20Plus%20Brochure.pdf> (11.03.2013)
- 29- Snyder EL, Calhoun BC. Topical platelet growth factor therapy: of lotions and potions. *Transfusion* 2001; 41: 1186- 1189.
- 30- Lowery GL, Kulkarni S, Pennisi AE. Use of autologous growth factors in lumbar spinal fusion. *Bone* 1999; 25(2 Suppl), 47S-50S.
- 31- Obata S, Akeda K, Imanishi T. Effect of autologous platelet-rich plasma-releasate on intervertebral disc degeneration in the rabbit anular puncture model: a preclinical study. *Arthritis research and therapy* 2012, 14:R241.
- 32- Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Path Oral Radiol Endod* 1998; 85: 638- 646.
- 33- Brissett AE, Hom DB. The effects of tissue sealants, platelet gels, and growth factors on wound healing. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery* 2003; 11: 245–250.
- 34- Smith RG, Gasmann CJ, Campbell MS. Platelet-rich Plasma: Properties and Clinical Applications *The Journal of Lancaster General Hospital* Summer 2007; Vol. 2, No. 2.
- 35- Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet Gel: An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55: 1294-1299.
- 36- Gigante A, Del Torto M, Manzotti S, et al. Platelet rich fibrin matrix effects on skeletal muscle lesions: an experimental study. *Biol Regul Homeost Agents*. 2012 Jul –Sep; 26 (3):475-84.
- 37- Gehring S, Hoerauf H, Laqua H, Kirchner H, Klüter H. Preparation of autologous platelets for the ophthalmologic treatment of macular holes. *Transfusion* 1999; 39: 144- 148.

- 38- Yol S, Tekin A, Yilmaz H, Küçükkartallar T, et al. Effects of platelet rich plasma on colonic anastomosis. *J Surg Res* 2008; 146(2): p. 190- 4.
- 39- Lopez Q. Treatment of large skin necrosis following a modified avelar abdominoplasty with the Erchonia EML, 635 nm Laser and Platelet-Rich Plasma. *The American Journal of Cosmetic Surgery* 2009; Vol. 26, No. 1.
- 40- Yokota K, Ishida O, Sunagawa T, Suzuki O, Nakamae A, Ochi M. Platelet-rich plasma accelerated surgical angio-genesis in vascular-implanted necrotic bone: an experimental study in rabbits. *Acta Orthop*, 2008; 79(1): p. 106- 10.
- 41- Efeoğlu C, Akçay YD, Ertürk S. A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. *J Oral Maxillofacial Surgery* 2004; 62(11): p.1403- 7.
- 42- Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp Neurol* 1996; 139:244-56.
- 43- Wnuk T, Blacha J, Mazurkiewicz T, Olchowik G, et al. The mechanical and histological estimation of calcaneal tendon callus in rats after PRP injection *Polish Orthopedics and Traumatology*, 2012; 77: 5-9.
- 44- Ivy K, Leite FR, Leite ER, Marcantonio EJ, Leite AA. Avoiding leukocyte contamination and early platelet activation in platelet-rich plasma. *J Oral Implantol*. 2007; 33(6):334-9.
- 45- He Y, Revel M, Loty B. A quantitative model of post-laminectomy scar formation. Effects of a nonsteroidal anti-inflammatory drug. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1995 Mar 1;20(5):557-63; discussion 579-80.
- 46- Bryant MS, Bremer AM, Nyugen TQ. Autogeneic fat transplants in the epidural space in routine lumbar spine: MR imaging assesment. *AJNR* 1988; 9: 169-178.
- 47- Görgülü A, Şimşek O, Çobanoğlu S, İmer M, Parsak T. The effect of epidural free fat graft on the outcome of lumbar disc surgery. *Nuerosurgical Review* 2004; 27(3): 181-184.
- 48- Prusick VR, Lint DS, Bruder J. Cauda Equina Syndrome as a complication of free epidural fat grafting. *J Bone Joint Surg* 1988; 70-A(8): 1256-1258.
- 49- Kuivila TE, Berry JL, Bell GR, Steffee AD. Heparinized materials for control of the laminectomy membrane in experimental laminectomies in dogs. *Clin OrthoRel Res* 1988; 236:166-173.

- 50- Gill GG, Sakovich L, Thompson E. Pedicle fat graft for the prevention of scar formation after laminectomy. An experimental study in dogs, *Spine* 4(2): 176-186, 1979.
- 51- Kemaloğlu S, Ozkan U, Yılmaz F, Nas K, Gur A, Acemoğlu H, Karasu H, Çakmak E. Prevention of spinal epidural fibrosis by recombinant tissue plasminogen activator in rats. *Spinal Cord* 2003; 41: 427-431.