

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

POSTERİOR VERTEBRAL FÜZYONUN İNTERVERTEBRAL
DİSK DEJENERASYONUNDA ORTAYA ÇIKAN
PROİNFLAMATUAR MEDIATÖRLER ÜZERİNDEKİ ETKİSİ
(TAVŞANLARDA DENEYSEL ÇALIŞMA)

DR. DAVUT DUMANLIDAĞ

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2016

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

POSTERİOR VERTEBRAL FÜZYONUN İNTERVERTEBRAL
DİSK DEJENERASYONUNDA ORTAYA ÇIKAN
PROİNFLAMATUAR MEDIATÖRLER ÜZERİNDEKİ ETKİSİ
(TAVŞANLARDA DENEYSEL ÇALIŞMA)

DR. DAVUT DUMANLIDAĞ

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. CAN KOŞAY

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim boyunca deneyimlerinden ve bilgilerinden büyük fayda gördüğüm sayın hocalarım; başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Hasan Havıtcıoğlu, Prof. Dr. Emin Alıcı, Prof. Dr. Osman Karaoğlu, Prof. Dr. Hasan Tatari, Prof. Dr. Halit Pınar, Prof. Dr. Haluk Berk, Prof. Dr. İzge Hakan Günal, Prof. Dr. Önder Baran, Prof. Dr. Vasfi Karatosun, Prof. Dr. Kadir Bacakoğlu, Prof. Dr. Mustafa Özkan, Prof. Dr. Ömer Akçalı, Doç. Dr. Mehmet Erduran, Yard. Doç. Dr. İsmail Safa Satoğlu, Doç. Dr. Onur Hapa, Uz. Dr. Ahmet Karakaşlı, Uz. Dr. Onur Başçı'ya;

Beni her konuda destekleyen; tez konumun seçilmesi, yürütülmesi ve tamamlanmasında yardımlarını esirgemeyen, danışman hocam Prof. Dr. Can Koşay'a;

Tezimin biyokimyasal incelemelerinin yapılmasında ve değerlendirilmesinde yardımcı olan, ayrıca tezimin tüm aşamalarında her türlü yardım ve desteği sağlayan Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim üyesi Prof. Dr. Gülgün Oktay ve Didem Keleş'e;

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım asistan arkadaşlarım, hemşirelerimiz ve diğer klinik çalışanlarına;

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan, benden hiçbir desteği esirgemeyen anneme ve babama;

Hayatıma anlam katan, beni yüreklendiren ve her koşulda yanımda olan sevgili eşim Ferah Dumanlıdağ'a;

Hayatımdaki en değerli varlık olan biricik oğlum Emir Dumanlıdağ'a

Sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarım.

DR. DAVUT DUMANLIDAĞ

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ	II
RESİM LİSTESİ	III
ŞEKİL LİSTESİ	IV
GRAFİK LİSTESİ	V
KISALTMA VE SİMGELER	VI
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1.GİRİŞ	4
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1.Omurmanın embriyolojik gelişimi	7
2.2.Omurmanın anatomisi	10
2.3.Vertebraalar	12
2.4.Ligamantöz yapılar	14
2.5.Omurğa innervasyonu	15
2.6.Omurmanın kanlanması	16
2.7.Omurmanın biyomekaniği	18
2.7.1.Omurğa biyomekaniğinin bölgesel özellikleri	19
2.7.2.Omurğa kaslarının biyomekaniği	21
2.7.3.Disk biyomekaniği	21
2.8.Disk anatomi ve fizyolojisi	25
2.9.Disk dejenerasyonu ve patofizyolojisi	27
2.10.Disk dejenerasyonuna yol açan risk faktörleri	29
2.11.Proinflatuar mediatörler	29
3.GEREÇ YÖNTEM	32
3.1.Cerrahi öncesi hazırlık	35
3.2.Cerrahi işlem ve gruplar	36
3.3.Sakrifikasyon	40
3.4.Değerlendirme kriterleri	43
3.5.Araştırma sonuçlarının değerlendirileceği istatistiksel yöntem	46
4.BULGULAR	47
4.1.Biyokimyasal analiz sonuçları	47
4.2.İstatistiksel analiz sonuçları	53
5.TARTIŞMA	61
6.SONUÇ	65
7.KAYNAKLAR	66

TABLO LİSTESİ

Tablo 1 : Gruplar ve yapılan işlemleri gösteren tablo	41
Tablo 2: ELİSA yöntemi (Rabbit ELISA kitleri) ile yapılan IL-1 β konsantrasyonu analiz sonuçları.....	47
Tablo 3: ELİSA yöntemi (Rabbit ELISA kitleri) ile yapılan IL 6 konsantrasyonu analiz sonuçları.....	48
Tablo 4: ELİSA yöntemi (Rabbit ELISA kitleri) ile yapılan MMP 3 konsantrasyonu analiz sonuçları.....	49
Tablo 5: ELİSA yöntemi (Rabbit ELISA kitleri) ile yapılan MMP 13 konsantrasyonu analiz sonuçları.....	50
Tablo 6: ELİSA yöntemi (Rabbit ELISA kitleri) ile yapılan NO konsantrasyonu analiz sonuçları.....	51
Tablo 7: ELİSA yöntemi (Rabbit ELISA kitleri) ile yapılan TIMP 1 konsantrasyonu analiz sonuçları.....	52
Tablo 8 : Tüm grupların tanımlayıcı istatistiksel analizi	53
Tablo 9 : Kruskal-Wallis test analizi.....	53
Tablo 10 : A ve B gruplarının Mann-Whitney U testi kullanılarak yapılan ikili karşılaştırma analizi.....	57
Tablo 11 : A ve C gruplarının Mann-Whitney U testi kullanılarak yapılan ikili karşılaştırma analizi.....	57
Tablo 12 : A ve D gruplarının Mann-Whitney U testi kullanılarak yapılan ikili karşılaştırma analizi.....	58
Tablo 13 : B ve C gruplarının Mann-Whitney U testi kullanılarak yapılan ikili karşılaştırma analizi.....	58
Tablo 14 : B ve D gruplarının Mann-Whitney U testi kullanılarak yapılan ikili karşılaştırma analizi.....	59
Tablo 15 : C ve D gruplarının Mann-Whitney U testi kullanılarak yapılan ikili karşılaştırma analizi.....	59
Tablo 16 : B grubunun (füzyon (-)), C ve D gruplarının toplamıyla (füzyon(+)) Mann-Whitney U testi kullanılarak yapılan ikili karşılaştırma analizi	60

RESİM LİSTESİ

Resim 1 : Yeni Zelanda Albino Cinsi Tavşan	31
Resim 2 : 2'şerli standart kafesler	34
Resim 3 : Cerrahi öncesi hazırlık.....	35
Resim 4 : Dejenerasyonun ilk aşaması olan , L6-L7 diskinin 18 gauge iğneyle dejenere edilmesini gösteren floroskopi görüntüsü.....	37
Resim 5 : Toplam 3 seviye dejenerasyonun tamamlandığı , L4-L5, L5-L6, L6-L7 disklerinin 18 gauge iğneyle dejenere edilmesini gösteren floroskopi görüntüsü	38
Resim 6 : Grup C ve Grup D'deki tavşanlara yapılan posterior vertebral füzyon	39
Resim 7 : Sakrifiye edilen bir tavşanın Lomber Omurgasının görüntüsü	40
Resim 8 : L4-L5 , L5-L6 ve L6-L7 disklerinin çıkarılmadan önceki görüntüsü.....	40
Resim 9 : Dejenerasyon yapılmayan diskin görüntüsü	41
Resim 10 : Dejenerasyon yapılan diskin görüntüsü	41
Resim 11: Grup D ' deki bir tavşanın postoperatif 5. Haftanın sonundaki operasyon bölgesinin görüntüsü.....	42
Resim 12 : Grup B ' deki bir tavşanın sakrifikasyon sonrası disklerinin alınması esnasındaki görüntü.....	43
Resim 13 : Grup B ' deki bir tavşanın sakrifikasyon sonrası disklerinin alınması esnasındaki görüntü.....	43
Resim 14 : Disklerin numaralandırılarak sırasıyla dizildiği kriyovaller	44
Resim 15 : Disklerin -80 °C 'de saklandığı dolap (Forma -86C ULT Freezer ,Thermo Electron Corporation)	45
Resim 16 : Tissue Lyser cihazı.....	46

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1 :Vertebral gelişimde erken somitik evre.....	8
Şekil 2 : Vertebra gelişim evreleri	9
Şekil 3 :Vertebral kolonun görünümü	11
Şekil 4 :Lomber vertebra'nın aksiyel ve lateral görünümü	13
Şekil 5:Omurganın ligamentöz yapıları	14
Şekil 6: Medulla spinalis'in posterior görünümü (Dural kılıf açılmış)	16
Şekil 7 (A,B) : Omurganın arteriyel dolaşımı , Omurganın venöz dolaşımı	17
Şekil 8:İki komşu vertebranın oluşturduğu hareketli segment yapısı	18
Şekil 9 : Processus articularis'lerin oluşturduğu faset eklem, posterior longitudinal ligaman, intervertebral disklerin, ligamentum flavumun, sakroiliak ve iliolumbar ligamanların arkadan görünüşü	20
Şekil 10 (A ,B) : Lomber bölgede diskus intervertebralis ve komşu vertebra korpusları ile ilişkisi, median kesit ve İntervertebral diskin iç yapısı	22
Şekil 11 (A,B) :Normal intervertebral disk ve dejeneratif intervertebral diskin strese karşı davranışı	24
Şekil 12: Disk anatomisi	25

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1 : Sırasıyla A,B,C ve D gruplarında NO mean değerlerini gösteren grafik.....	54
Grafik 2 : Sırasıyla A,B,C ve D gruplarında IL-1 β mean değerlerini gösteren grafik	54
Grafik 3 : Sırasıyla A,B,C ve D gruplarında MMP 3 mean değerlerini gösteren grafik	55
Grafik 4 : Sırasıyla A,B,C ve D gruplarında TIMP 1 mean değerlerini gösteren grafik	55
Grafik 5 : Sırasıyla A,B,C ve D gruplarında MMP 13 mean değerlerini gösteren grafik ..	56
Grafik 6 : Sırasıyla A,B,C ve D gruplarında IL 6 mean değerlerini gösteren grafik.....	56



KISALTMA VE SİMGELER

NO	Nitrik oksit
TIMP 1	Tissue inhibitör of metalloproteinases
IL 1β	İnterlökin 1 beta
MMP 3	Matriks metalloproteinaz 3
MMP 13	Matriks metalloproteinaz 13
IL 6	İnterlökin 6
TNF α	Tümör Nekroz Faktor α
PGE 2	Prostoglandin E2
TGF β	Transforming growt faktör β
İV	İntravenoz
İVD	İntervertebral disk
İVDD	İntervertebral disk dejenerasyonu
AP/LAT	Anterior-posterior / Lateral
OP 1	Osteojenik Protein 1
DMSO	Dimetil sülfoksit
mm	milimetre
cm	santimetre
cm³	santimetre küp
mg	miligram
kg	kilogram
μmol/l	mikromol /litre
pg/ml	pikogram/mililitre

ÖZET

Amacı: Tavşan omurgasında geliştirilen disk dejenerasyon modelinde dejenerasyon sonrası disklerdeki proinflatuar mediatör değişimlerini ve posterior vertebral füzyonun bu değişime etkisini saptamak.

Gereç-Yöntem: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji ABD. ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı bünyesinde yapılan ve hayvan deneyleri yerel etik kurulu onayı alan çalışmamız ; erişkin 3-3,5 kilogram ağırlığında 24 adet dişi Yeni Zelanda albino tavşan üzerinde gerçekleştirilmiştir. Tavşanlar eşit sayıda dört gruba ayrılmıştır. Grup A (Sham grubu) : Dorsal cerrahi girişim yapılan ancak disk hasarı oluşturulmayan, füzyon yapılmayan grup. Grup B : Dorsal cerrahi girişim ile disklere hasar verilen ancak füzyon yapılmayan grup. Grup C: Dorsal cerrahi girişim ile disklere hasar verilen ve vertebral füzyon yapılan grup. Grup D: Dorsal cerrahi girişim ile disklere hasar verilen, vertebral füzyon yapılan ve füzyon sonrası uzun dönem sonuçları değerlendirmek için ‘ C ’ grubundan 4 hafta sonra sakrifiye edilen grup. Grup B , C ve D deki hayvanların alt üç lomber diskinde lateral oblik prone pozisyonda, skopi eşliğinde 18 gauge iğne ucu ile delici yaralanma yapılarak hasar yaratılmıştır. Grup C ve D’de aynı zamanda alt üç lomber vertebraya , lamina ve spinöz proses dekortikasyonu ve aynı insizyonla ulaşılan iliak kanattan alınan 1-1,5 cm³ lük otogreftin (kemik doku) bu alana yerleştirilmesiyle posterior ve posterolateral spinal füzyon oluşturulmuştur. Her tavşan yüksek doz IV pentotal (100mg/kg) ile sakrifiye edilerek diskler alınmıştır. İndeks cerrahi sonrası birinci haftanın sonunda Grup A,B ve C’deki tavşanlar, beşinci haftanın sonunda ise Grup D’ deki tavşanlar sakrifiye edilerek diskler elde edilmiştir. Alınan disklerdeki NO, IL-1 β , TIMP 1, IL 6, MMP 3 ve MMP 13 düzeylerinin biyokimyasal analizi Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarında yapılmıştır. Grupların karşılaştırılmasında Kruskal Wallis Varyans Analizi kullanılmıştır. Grupların ikili karşılaştırılmalarında ise Mann Whitney U Testi kullanılmıştır. Anlamlılık düzeyi p<0.05 kabul edilmiştir.

Bulgular : Grup B, C ve D’ de tüm proinflatuar mediatör düzeyleri Grup A ‘ya göre anlamlı derecede yüksek saptandı. D grubundaki NO , IL-1 β ve TIMP 1 düzeylerinin B grubuna göre anlamlı ölçüde düşük olduğu görüldü. Füzyon yapılan C ve D gruplarının füzyon yapılmayan B grubuyla karşılaştırıldığında tüm proinflatuar mediatörler önemli ölçüde düşük saptandı.

Sonuç : Bu çalışmada geliştirdiğimiz tavşan omurgasında disk dejenerasyon modeliyle; disk dejenerasyonunun proinflatuar mediatörleri arttırdığını saptadık.Füzyon yapılan ve beklenen grupta ise bu mediatörlerin azaldığını tespit ettik. Bu sonuçlar, posterior vertebral füzyonun bel ağrısının giderilmesindeki rolünü açıklayabilir. Bu çalışmadaki disk dejenerasyonu ve füzyon modeli gelecekte disk dejenerasyonu kaynaklı bel ağrısını önlemeye yönelik çalışmalarda kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler : İntervertebral disk dejenerasyonu , füzyon , proinflatuar mediatörler



ABSTRACT

EFFECTS OF DISC DEGENERATION AND VERTEBRAL FUSION ON PRO-INFLAMMATORY MEDIATORS IN A RABBIT INTERVERTEBRAL DISC DEGENERATION MODEL

Pro-inflammatory mediators play important role in pain mechanism during intervertebral disc degeneration. Alterations of pro-inflammatory mediators in disc degeneration have been discussed in previous studies. But effects of vertebral fusion on these mediators are not clear. The purpose of this study is to determine the alterations of pro-inflammatory mediators after vertebral fusion in a rabbit disc degeneration model.

Materials and Methods: Twenty-four New Zealand Albino rabbits were used in this study in accordance with local ethics committee for animal studies. Four different groups were considered: In group A (Sham) dorsal spinal exposure was done but no disc degeneration or vertebral fusion was performed. In group B, both dorsal spinal exposure and disc degeneration was applied but no fusion was performed. In group C, dorsal spinal exposure, disc degeneration and fusion were all applied. In group D, same procedures were applied as group C but sacrificed after 4 weeks. Disc degenerations were obtained by puncturing the discs with 18-gauge needle puncture under C-arm imaging control after dorsal spinal exposure. In group C and D posterior and postero-lateral decortication, fusion with iliac bone grafts were performed. In first week, Group A, B and C, in fifth week Group D was sacrificed. In group D, fusion was assessed by inspection and by manual palpation. Intervertebral discs were removed and Interleukin (IL)-1 β , IL-6, Nitric Oxide (NO), Matrix MetalloProteinases (MMP)3-(MMP)13, Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMP) 1 levels in discs were analysed by elisa kits. Kruskal Wallis Variance and Mann Whitney U tests were used.

Results : All pro-inflammatory mediators levels in Group B, C and D were significantly higher than Group A. IL-1 β , NO and TIMP 1 levels in group D were significantly lower than Group B. Mediator levels in fusion groups (C & D) were significantly lower than the non-fusion group (B).

Conclusion: Increase in pro-inflammatory mediators after intervertebral disc degeneration were detected in rabbit model. Decrease in these mediators was obtained in posterior vertebral fusion groups after degeneration. These results may be helpful in clarifying the role of vertebral fusion in low back pain.

Key words: intervertebral disc degeneration, fusion ,pro-inflammatory mediators

1. GİRİŞ

Bel ağrısı ; toplumda çok yaygın görülen, fonksiyonel kapasiteyi büyük oranda kısıtlayarak, ekonomiyi ve refah seviyesini olumsuz yönde etkileyen bir hastalıktır. Bel ağrısı , maluliyetin majör etkenlerinden biridir ve günlük aktivitelerde önemli kısıtlamalar oluşturur . Bu nedenle sosyoekonomik etkilerine bakacak olursak tüm popülasyonu etkileyen büyük ekonomik kayıplara yol açan bir klinik antitedir.(1)

İntervertebral disk dejenerasyonunun bel ağrısına yol açan major etkenlerden olduğu bilinmektedir. İntervertebral disk dejenerasyonu, tanısı ve tedavisi zor olan klinik bir sorundur . İntervertebral disklerdeki dejenerasyon sonucunda hareket segmentinin biyomekanik özelliklerini değişmesiyle sonuçlanan bir seri biyokimyasal ve morfolojik değişimlerin sonucudur. Bu biyokimyasal değişimlerin tanımlanması ve buna yönelik tedavisi ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Fakat ağrıya yol açan dejenere disklerde ortaya çıkan nörovasküler yapılar ve disk kaynaklı ağrıların patofizyolojisi tam olarak bilinmemektedir.

İntervertebral disk hasarı sonrasında diskte inflamatuvar mediatörlerin arttığı ve bu artışında dejenerasyonu arttırdığı gösterilmiştir.(2) Bu mediatörlerin gösterilmesi ve etkileyen faktörler bir çok çalışmanın konusunu oluşturmuştur. Hsiesh ve Lotz 25 fare üzerinde koksigeal bölgedeki disklerde kompresyonla disk dejenerasyon modeli oluşturmuş. intervertebral disk yüklenmesinin artması sonucu matriks metalloproteinaz 2'nin arttığını ortaya koymuştur.(3) Kang ve ark. lomber disk herniasyonu olup diskektomi operasyonu geçiren 15 hastadan toplam 18 lomber disk örneği incelemiş ve kontrol grubuna göre önemli ölçüde artmış IL 6 ($p < 0.035$), PGE 2 ($p < 0,0056$) ve NO ($p < 0,000036$) seviyeleri saptamıştır.(4)

Kepler ve ark. diskojenik ağrı sebebiyle diskektomi ameliyatı olan hastalardan elde edilen 7 diski , ağrıya yol açan herhangi bir disk ya da spinal patolojisi olmadığı bilinen otopsilerden elde edilen 9 disk örneğiyle karşılaştırmış. Bu çalışmaya göre ağrıya yol açan disklerde IL-1 β düzeyi anlamlı olarak yüksek bulunmuş.($p < 0,03$) (5)

Myagi ve ark. Sprague Dawley türü ratlarda oluşturdukları İVDD modelinde İVD dinamik kompresyonu ile hasarı sonrasında TNF α ve IL-1 β 'nın akut dönemde önemli ölçüde arttığını göstermiştir.($p < 0,05$) (6) Purmessur ve ark. TNF α 'nın sığır İVD

kültüründe katabolizmayı aktive ederek matriks proteinlerinin degradasyonuna sebep olduğunu ve dejenerasyonu daha da arttırdığını göstermiştir. Dejenerasyon sonrası da IL-1 β , MMP 3 ve MMP 13'ünde önemli ölçüde yükseldiğini belirtmiştir.(7) Schroeder ve ark. toplam 21 hastadan alınan diskler üzerinde yapılan çalışmada TNF α ($p < 0,008$), MMP 3 ($P < 0,025$) ve TGF β ' nın ($P < 0,028$) kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, İVDD' da önemli ölçüde arttığını göstermiştir. (8)

Bu çalışmalar hayvan deneyleri (3,6,7) veya insan disklerinden elde edilen örneklerle (2,4,5,8,9) yapılmaktadır. Ayrıca bu mediatörlerin regülasyonu,böylece disk dejenerasyonunun kontrolü veya azaltılmasına yönelik çalışmalar da yapılmıştır.(9,10,11)

Disk dejenerasyonu nedeniyle seçilebilecek füzyon metodları anterior veya posteriordur. Günümüzde bu metodların ağrıyı nasıl ortadan kaldırdığı bilinmemektedir. Posterior vertebral füzyon daha sık uygulanan bir metod olmasına rağmen füzyon sonrası diskte meydana gelen biyokimyasal değişimler ile ilgili hiçbir çalışma yoktur.Bu nedenle; tavşanlar üzerinde yapılan bu çalışmada disk hasarı oluşturulduktan sonra disklerde meydana gelen inflamatuvar mediatör değişikliklerinin, posterior füzyon yapılan ve yapılmayan gruplardaki farklılıkların biyokimyasal yöntemlerle gösterilmesi amaçlanmıştır.

Boden tavşanlar üzerinde uygulanan ve birçok avantajı olan posterolateral spinal füzyon modelini ilk olarak ortaya atmıştır. Boden'in tavşanlarda tanımladığı bu modele göre posterolateral spinal füzyon, posterior mid-line insizyonla ve tek seviye olarak transvers proseslerin bilateral paraspinal eksplorasyonu ile yapılır.9 aylık (4.5-5 kg) olan tavşanlarda Lomber vertebralardan L4-L5 veya L5-L6'yı tercih etmiştir.İliak kanattan 2-2.5 cm³ kadar alınan grefti kullanmıştır. Füzyonun başarısını anlamak için palpasyonun geçerli ve güvenilir bir yöntem olduğunu belirtmiştir.(12)

Riordan ve ark.nın yaptığı çalışmaya göre başarılı füzyon için en az 5 hafta süre geçmeli,hayvanın yaşı > 6 ay ve ağırlığı >3 kg olmalı, iliak kanattan alınan kemik grefti >1 cm³ ,seviye ise L4-L5 veya L5-L6 olmalıdır.Bu bilgiler bundan sonra yapılacak olan çalışmalarda posterolateral füzyonu optimize etmek için kullanılabilir.(13) Bu çalışmaya göre; Boden modelinde olduğu gibi cerrahi sırasında yapılan manuel palpasyon psödoartrozu görmek için kullanılan altın standart bir klinik bulgudur .

Palumbo ve ark.sakrifiye 16 tavşan üzerinde yaptıkları çalışmaya göre tavşanlarda toplam 7 lomber vertebra bulunmakta iliak kanatları birleştiren çizgi L6-L7 interspinoz mesafeye denk gelir ve bu mesafe diğer lomber interspinoz mesafelerden daha uzundur.İnsanlardan farklı olarak intervertebral foramen transvers proseslerin dorsalinde kalır.(14) Kwon ve arkadaşları resveratrolun dejenere olmuş tavşan disklerindeki anabolik/antikatabolik etkilerini araştırmıştır.Bu çalışmadaki hayvan modelinde 18 gauge iğne ile floroskopi yardımıyla L2-L3 ve L4-L5 disklerine delici yaralanma yapılmıştır.(15)

Valdes ve ark . tavşanlarda tanımlanan posterolateral spinal füzyon modelinin cerrahi tekniğini incelemiştir. Çalışmanın sonucunda en sık komplikasyonları ;Sinir paralizisi,yanlış seviye füzyonu,enfeksiyon ve anestezi komplikasyonları olarak belirlemiştir. (16) Jonathan ve ark.füzyon başarısını ölçmek için palpasyon ve fleksibilite testinin güvenilir olduğunu savunmuştur. (17) Jason ve ark. yaptığı review çalışmada büyük iliak kanat kemik grefti alınan ve uzun süre beklenen hayvanlarda yüksek füzyon oranları saptamıştır. Yaş, ağırlık,strain,ve seviyenin füzyon oranına etki etmediğini savunmuştur.(18) Kant ve ark. yaptıkları çalışmaya göre radyografi cerrahi eksplorasyon ve manuel palpasyona göre füzyonu spesifik olarak % 68 oranında gösterebilmiş.(19)

Çalışmamızın sonunda disk homojenatlarından elde edilecek olan berrak süpernatant materyalinden daha önce yapılan çalışmalarla disk hasarı sonrası arttığı ve ağrı oluşumunda rol oynadığı gösterilen; Nitrik Oksid (NO), Tissue Inhibitor Matriks Metalloproteinaz 1 (TIMP 1), Matriks Metalloproteinaz 3 ve 13 (MMP-3 ve MMP-13), Interlökin 6 ve IL-1 β ELİSA yöntemi (Rabbit ELISA kitleri) ile analiz edilecektir.(20)

Bu çalışma sonucunda elde edeceğimiz veriler , posterior vertebral füzyon varlığında inflamatuvar mediatörlerdeki değişiklikler hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlayacak ve sıklıkla görülen posterior vertebral füzyon sonrası kalabilen ağrının nedenleri ve füzyonun ağrıyı ortadan kaldırma mekanizması açıklanacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

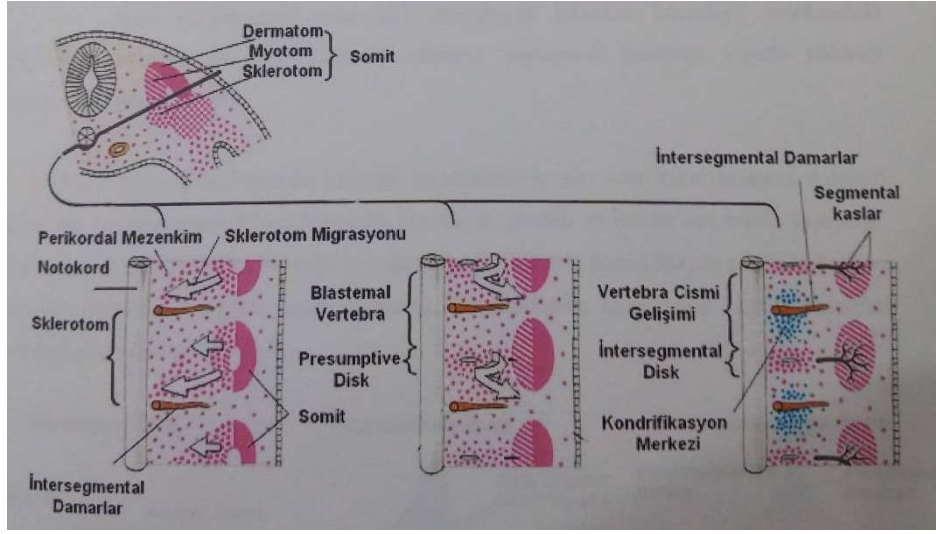
2.1.Omurganın embriyolojik gelişimi

Nörovertebral aksın ektodermal,nöral ve mezodermal vertebral komponentin birbiriyle çok yakın ve birbirini etkileyen topografik ilişkileri vardır. Embriyoda gelişen ilk major organ sistemi nörovertebral akstır (21). İlkel barsak borusu ile nöral kanal arasında bulunan mezoderm hücreleri,embriyonun başından kuyruğuna kadar uzanan ince bir sütun meydana getirirler. Korda dorsalis (notocord) adı verilen bu oluşum,iskelet sisteminin en ilkel şeklidir ve sonra dejenere olup kaybolan korda dorsalis artıklarından sadece nükleus pulposuslar kalır(22).

Notokordal hücrelerin varlığı ektodermin kalınlaşmasını azaltır, bu şekilde nöral plak meydana gelir.Onsekizinci günde nöral plağın uçları yukarı doğru kıvrılır ve bunların birleşmesiyle dorsal nöral tüp oluşur.

Notokord ve nöral tüpün gelişmesine paralel olarak, bu yapıların yanındaki mezoderm uzunluğunca iki sütun oluşturmak için kıvrılır. Böylece 19. günde mezodermin üç ayrı yerinde proliferasyon plağı gelişir. Bu plakların iç tarafında önceleri düz ve birbirine eşit uzaklıkta olan transvers oluklar derinleşmeye başlar ve üçüncü haftada 38-41 adet somit meydana gelir. Kısa bir süre sonra somitlerin korda dorsalise yakın olan tarafında, mezoderm hücreleri çoğalarak değişmeye başlar ve orta çizgiye doğru hareket ederek somitlerin medial tarafından sklerotom denilen uzantılar meydana gelir. Somitler ayrıca dermatom ve myotoma farklılaşır bunlarda laterale hareket ederek vertebraların membranöz prekürsörlerini oluşturur.

Başlangıçta sklerotomlar birbirine eşit segmentler şeklinde embriyonun eksenine dik olarak sıralanırlar ancak zamanla segmentler arasındaki sınırlar silinir.Aort ile nöral kanal arasına sokulan sklerotom hücreleri aksiyel mezenkim adı verilen bir silindir meydana getirir(22). Bu oluşum bütün omurganın taslağıdır. Bu esnada her bir sklerotom,kranial ve kaudal olmak üzere iki parçaya ayrılır ve bu parçalar arasındaki aralıklara instrasegmental aralık denir. Bu aralıklar gelişerek, sonradan erişkinlerde görülen intervertebral aralıkları oluşturur. Böylece instrasegmental aralıklar aracılığıyla aksiyel mezenkim, birçok eşit parçaya ayrılmış olur. Bu parçalar ayrı ayrı vertebraların taslaklarını yaparlar ancak , myotomların



Şekil 1 :Vertebral gelişimde erken somitik evre

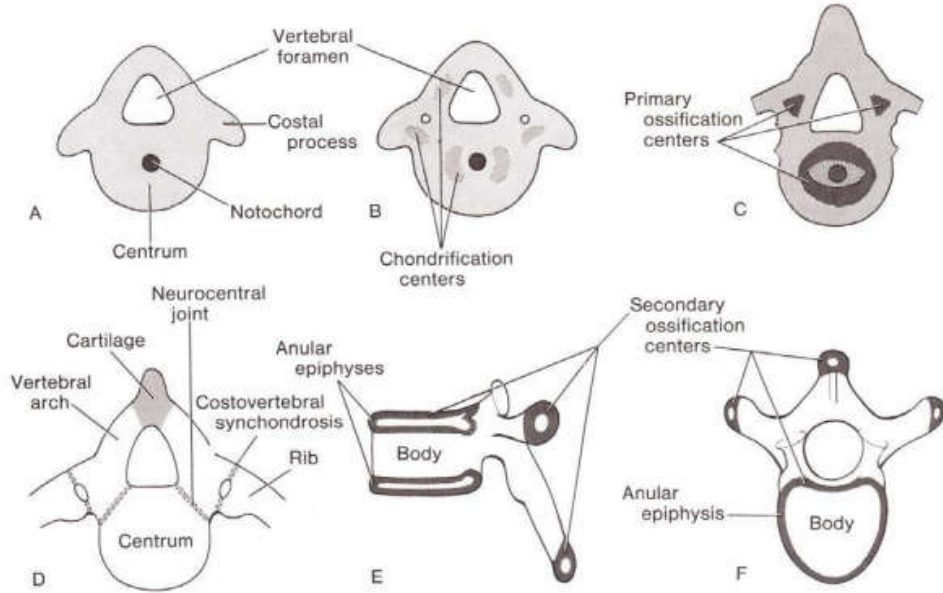
segmentasyonu eskisi gibi kalır. Bu yüzden aynı somitten kaynaklanan myotom ve vertebra taslakları aynı hizaya düşmezler. Her myotom karşısında birbirinden intervertebral aralıklara ayrılmış iki vertebra taslağının parçaları bulunur (21,22,23)

Bir süre sonra her vertebra taslağının ön ve arkasında ikişer adet olmak üzere dört çıkıntı meydana gelir. Bunlardan arkaya doğru uzanan iki tanesi nöral kanalın yanından geçerek arkada birleşip, arkus vertebrayı oluşturur. Her iki tarafta yana ve öne doğru uzanan çıkıntılardan göğüste kostalar oluşur. boyun ve bel kısmında bu çıkıntılar kısa kalır ve vertebraların transvers çıkıntıları ile birleşirler (22,23).

Bu sırada vertebraların merkezini oluşturacak kıkırdak hücreleri, merkezdeki notokordu çevirirler ve onun dejenere olmasını sağlayarak jelatinöz yapıda nükleus pulposusu oluştururlar (22).

Altıncı haftada membranöz omurga mezenkiminde altı adet kıkırdaklaşma merkezi belirir. Bu merkezlerden ikisi notokordun lateralinde görülür ve bunlar notokorda yapışırlar. İki merkez ise nöral kanalın lateralinde yoğunlaşır ve bunların dorsal füzyonu ile nöral ark ve processus spinosus meydana gelir. Kalan iki kıkırdaklaşma merkezinin lateral uzantıları transvers çıkıntıları oluşturur (22).

Yedinci ve sekizinci haftalarda kıkırdak vertebrayı çevreleyen interstisyel matriksten anterior ve posterior bağlar oluşur (22).



Şekil 2 : Vertebra gelişim evreleri

Dokuzuncu hafta civarında kemikleşme hazırlıkları, kaburganın çevresindeki damarların ilerlemeye başlar. Onaltıncı haftada kemikleşme normal gelişmekte iken tüm merkezler aynı anda ortaya çıkmaz. İlk merkezler önce alt torasik ve üst lomber bölgelerde belirir. 20-24 haftalar arasında kemikleşme merkezinin gelişmesiyle, korpus iki kıkırdak tabakaya bölünür, sonunda bunlar intervertebral disk yüzeyinde kıkırdak plaklar olarak kalır. Vertebralar arasındaki diskin alt ve üst yüzeyinde önde ve yanlarda periferel "c" şeklinde kıkırdak halka gelişir ve apofizi oluşturarak yaşamın ikinci dekatında kemikleşir (22).

İskeletin diğer kemikleri gibi vertebranın kemikleşmesi de birincil ve ikincil merkezler içerir. Her vertebra biri cisim, ikisi vertebra halkası için üç birincil merkezden türer ve vertebralar encondral olarak kemikleşir (23). Bunların dışında vertebrada beş sekonder ossifikasyon merkezi bulunmaktadır ve 15-16 yaşlarında bu merkezler transvers ve spinöz çıkıntılar ucunda ortaya çıkar.

2.2.Omurganın anatomisi

Columna vertebralis (omurga), baş ve gövdenin ağırlığını alt ekstremiteye aktaran, medulla spinalis'i çepeçevre sararak koruyan, gövdede yeterli hareketin sağlanmasına izin veren bir sütundur. Vertebra (omur) adı verilen kemiklerin, gövdenin arkasında ve orta çizgi üzerinde üst üste dizilmesi ve ligamentlerle birbirlerine bağlanması ile meydana gelir(23,24). Omurga dizilimini oluşturan omurlar bulundukları bölgeye göre adlandırılırlar. Erişkin bir insan omurgasında 7 servikal, 12 torakal, 5 lomber, 5 sakral ve 4 koksigeal olmak üzere toplam 33 vertebra bulunmaktadır. İlk 24 vertebra birbirleri ile hareketli eklemler aracılığı ile bağlanmış olduklarından dolayı gerçek vertebra, hareketli vertebra veya presakral vertebra olarak isimlendirilirler. Sakrumu ve koksiksi oluşturan geri kalan 9 vertebra ise kendi aralarında kaynaştıkları için bunlara yalancı vertebra veya sabit vertebra adı verilir (23,24).

Omurga mekanik bir yapıdır. Omurganın kendisinde de bir miktar bağsal kararlılık olmasına rağmen, mevcut mekanik stabilitesinin büyük kısmı, iyi gelişmiş dinamik nöromusküler yapılara ve merkezi kontrol sistemine bağlıdır. Omurganın ortasındaki medulla spinalisi koruyacak şekilde düzenlenmiştir (24).



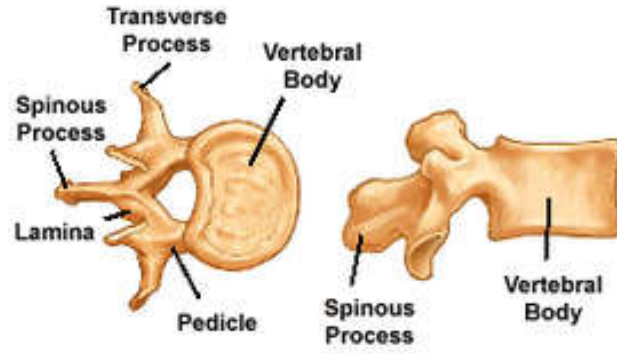
Şekil 3 :Vertebral kolonun görünümü

2.3. Vertebralar

Omurga yedi servikal, oniki dorsal, beş lomber ,beş sakral,dört koksiks parçasından oluşur. Omurgaya frontal düzlemden bakılırsa, genellikle düz ve simetrik olarak görülür. Sagital düzlemde ise omurgada dört ayrı eğrilik görülür; servikal ve lomber bölgelerde lordoz, torakal ve sakral bölgelerde ise kifoz mevcuttur. Bu eğrilikler daha çok eğilme yeteneği sağlarlar, şok etkilerini azaltırlar ve omurgaya stabilite kazandırır. Torakal ve sakral eğrilikler yapısalıdır. Kemik ve ligamantöz yapı bu özelliği sürdürür. Buna karşın servikal ve lomber eğrilikler değişkendir ve bu özellik intervertebral disklere geniş hareket olanağı verir (24).

Birinci vertebra hariç bütün vertebraların korpus ve vertebral ark olmak üzere iki esas parçası vardır. Vertebra korpusu yapı ve büyüklük olarak değişken olmakla birlikte, torakal bölgede kaudale indikçe giderek büyür ve kosta başları ile iki adet eklem yapar (fovea costales). Süperior parça genellikle büyük ve pedikülün önünde bulunurken, inferior parça alt sınıra yakın vertebral notch önünde bulunur(24,25). Korpusun üst ve alt yüzleri komşu korpusları birbirlerine bağlayan intervertebral disklere yapışır. Bu yüzlerde kemik korteks bulunmaz. Korpusun ön, arka ve yan kenarlarında ise 2-3 mm'lik bir kısım korteks ile örtülüdür(24).

Vertebra korpusunun arka yüzeyinde arkus vertebralis, pedikül adlı kısım ile başlar ve her iki yanda lamina olarak devam eder. Sonra iki lamina spinöz process oluşturmak üzere birleşir (25). Önde korpus, arkada pedikül, yanlarda lamina ile sınırlanan halkaya foramen vertebrale denir. İçinden medulla spinalis geçer. Her iki pedikülün üst ve alt kenarlarında birer çentik bulunur. İki komşu vertebra'nın bu çentikleri birleşerek yanlara açılan ve içinden spinal sinirler geçen foramen intervertebrale adlı delikleri oluşturur (24).



Şekil 4 :Lomber vertebra'nın aksiyel ve lateral görünümü

Pediküllerin arkasında her iki tarafta yukarı ve aşağı doğru uzanan birer çıkıntı vardır. Her vertebrada dörder adet olan bu çıkıntılarda değişik seviyelere farklılık gösteren eklem yüzleri bulunur. Üsttekilere processus articularis superior, alttakilere processus articularis inferior adı verilir. İki komşu vertebranın aynı tarafında çıkıntılar üzerindeki eklem yüzeyleri birbirleriyle temas ederek, faset eklemleri meydana getirirler. Diartroz cinsinden olan bu eklemler ve elastiki bağlarla bağlanmıştır. Diğer diartroz eklemlerde olduğu gibi, bunların da eklem kıkırdakları, boşlukları, kapsül ve sinoviyal zarları bulunmaktadır. Bazı vertebralarda eklem çıkıntıları seviyesinde, bazıları ise biraz daha arkada olmak üzere kavsin her iki tarafında yanlara doğru uzanan transvers çıkıntılar görülür. Torakal bölgede transvers çıkıntıların uçlarının ön yüzlerinde kostal tüberküllerle eklem yapan küçük eklem yüzleri bulunur. Vertebralar önde intervertebral disklerle, arkada faset eklemleri ile ilişki içindedir (24,25).

Lomber vertebraların korpusları diğer vertebralarından büyük olup üstten bakıldığında fasülyeye benzer. Spinöz çıkıntıları kısa, geniş ve dolgundur. Korpusların ön yüksekliği arkaya nazaran daha fazladır. Üst eklem çıkıntısının dış yan yüzlerinde prosesus mamillaris adında tüberkülleri vardır (23,24). Vertebra korpusları, intervertebral diskler aracılığıyla birbirlerine bağlanırlar. Bunlar amfiartrodial tipte eklemleşmeyi sağlayan, fibrokartilajinöz yapıdaki oluşumlardır. Omurgada 23 adet disk mevcuttur ve bir üst vertebraya göre isimlendirilirler. Disklerin büyüklük ve şekilleri omur cismi ile uyumludur. Disklerin kalınlıkları 5 ile 12 mm arasında değişir. Böylece sakrum ve koksiks hariç omurga uzunluğunun dörtte birini teşkil ederler (24).

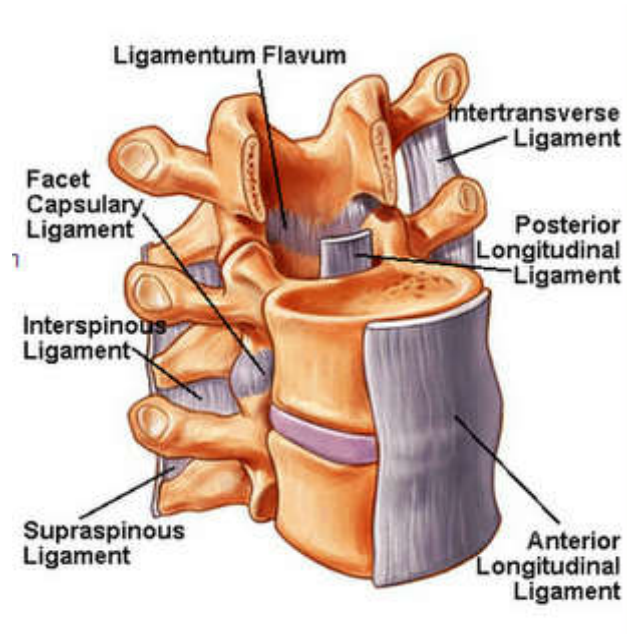
2.4.Ligamentöz yapılar

Anterior longitudinal ligament; oksipital kemikten başlayarak tüm vertebraların ön yüzüne yapışan bağıdır. Vertebra korpuslarına sıkıca tutunmasına rağmen,intervertebral diskin anüler liflerine sıkı tutunamazlar (24,25).

Posterior longitudinal ligament; oksipital kemiğin arka yüzünden başlayarak korpusların arkasından koksikse kadar uzanır. Anterior bağdan farklı olarak disk hizasında daha geniş ve daha sıkı,lateral cismin hizasında ise daha dardır (24,25).

İntertransversal ligament; transvers çıkıntılar arasında yer alır (25). Kapsüler ligament; faset eklemler arka tarafında bulunur(25). Ligamentum flavum; laminanın anterior inferior sınırından,alttaki laminanın posterior sınırına ulaşır. Çok miktarda elastik lifler içerdiğinden rengi sarımtıraktır (24,25). İnterspinöz ligament komşu spinöz processler arasında uzanır.

Supraspinöz ligament; spinöz çıkıntılardan uçlarını birbirine bağlayan bağıdır ve servikal bölgede genişleyip, kalınlaşarak ligamentum nuchae adını alır (24,25).



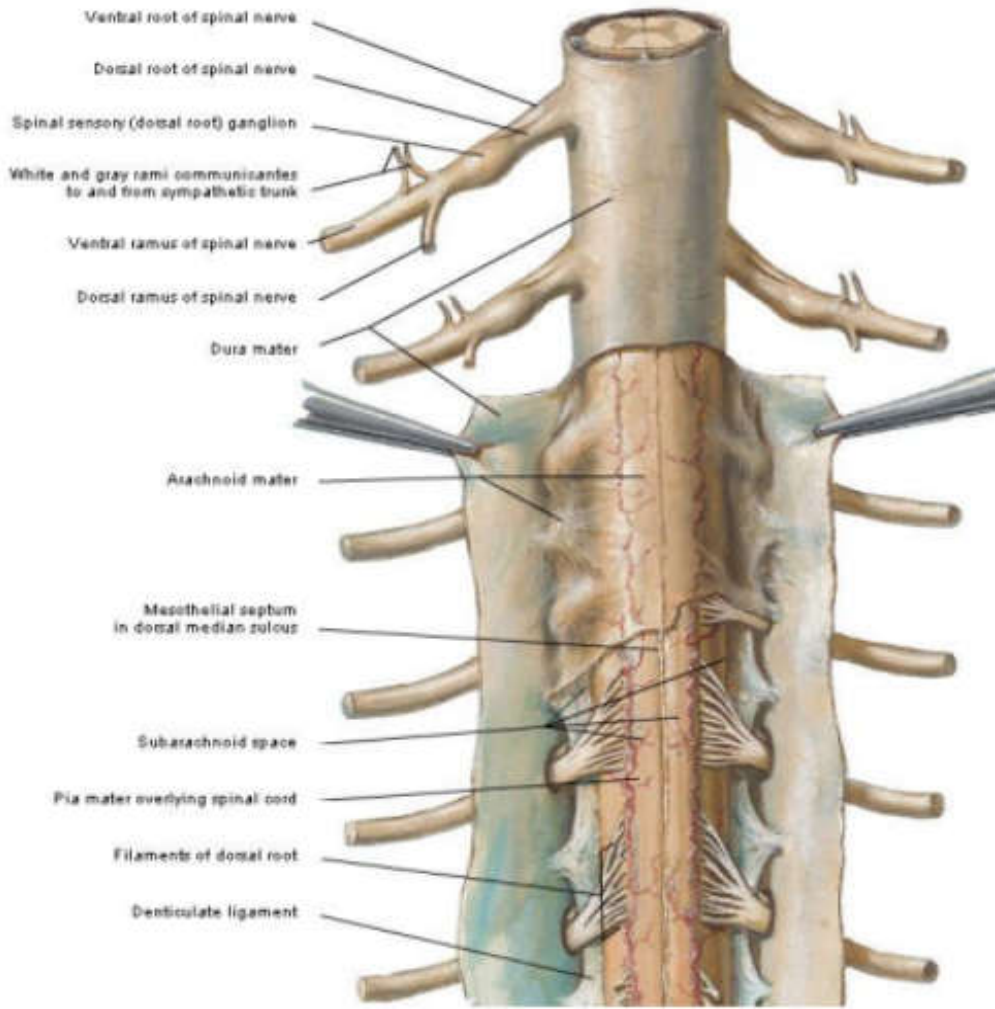
Şekil 5:Omurganın ligamentöz yapıları

2.5. Omurga innervasyonu

Foramen vertebrale içinde beyinden çıkarak aşağı doğru uzanan medulla spinalis bulunur. Medulla spinalisten boyun bölgesinde sekiz, torakal bölgede oniki, lomber bölgede beş, sakral bölgede beş sinir kökü ayrılarak periferik doğru uzanır. Bu sinir kökleri boyun bölgesinde medulla spinalisten çıktıktan hemen sonra, bel bölgesinde ise bir süre kanalis vertebralis içinde yol aldıktan sonra intervertebral aralıktan vertebrayı terkeder (24).

Her spinal sinirin rekürrent bir dalı vardır; buna sinüvertebral sinir denir. Bu sinir intervertebral foramenden geriye kıvrılarak, vertebral kanalla ilgili vasküler yapılar, periost ve annulus fibrosus'a dallar verir. Sinüvertebral sinir, intervertebral foramene üst tarafından genellikle korpusun dorsalateral yüzü ile buna ait kökü arasından girer. Pedikül tabanı civarında yukarı kıvrılarak, posterior longitudinal ligamana varırken, süperior ve inferior dallara ayrılır. Sinir yolu boyunca dura, ligamentler, periost ve epidural damarlara sayısız dallar verir (24).

Dorsaldaki intervertebral eklemlerin duyu innervasyonu, spinal sinirlerin posterior dallarından olur. Bu dal faset eklemlerin kapsüllerini, ligamentum flavum ve ligamentum interspinaleyi innerve eder (24).

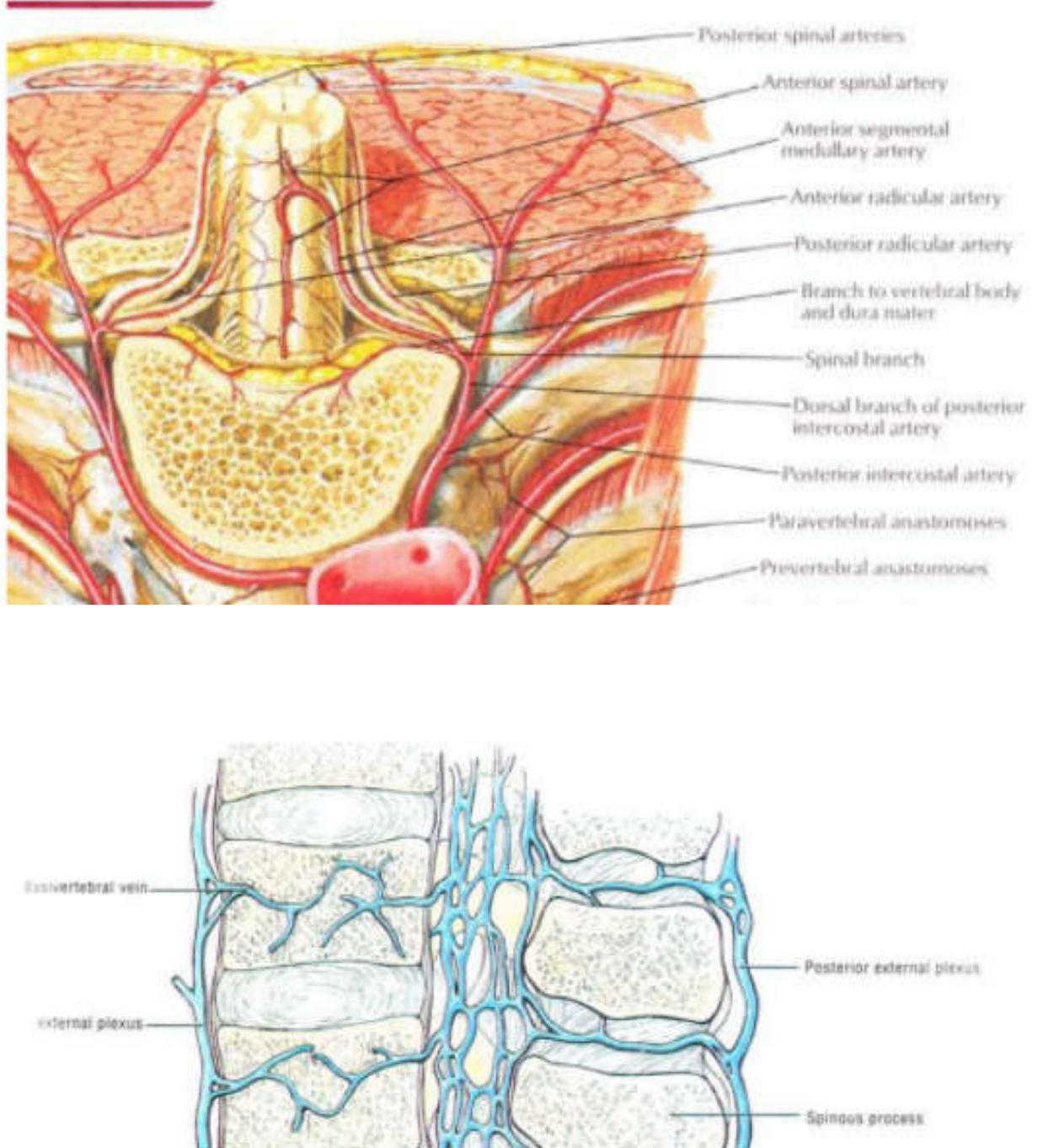


Şekil 6: Medulla spinalis'in posterior görünümü (Dural kılıf açılmış)

2.6.Omurganın kanlanması

Her vertebra beslenmesini bir segmenter arterden ya da bunun bölgesel bir eş değerinden, anterior santral, posterior santral,prelaminar ve postlaminar dallardan oluşan bir damar sisteminden sağlar. Anterior santral ve postlaminar dallar, omurga dışı damarlardan kaynaklanır. Posterior santral ve prelaminar dallar, spinal dallardan köken almışlardır.

Omurgada arteriyel dağılım alanına uyan, iki ayrı ven sistemi vardır. Bunlar internal ve eksternal ven sistemleridir. Eksternal ven sistemi, anterior ve posterior venöz pleksustan ibarettir. İnternal venöz pleksus düzensiz epidural sinüsler olup, koksiksten foramen magnuma kadar uzanır(24).



Şekil 7 A : Omurganın arteriyel dolaşımı

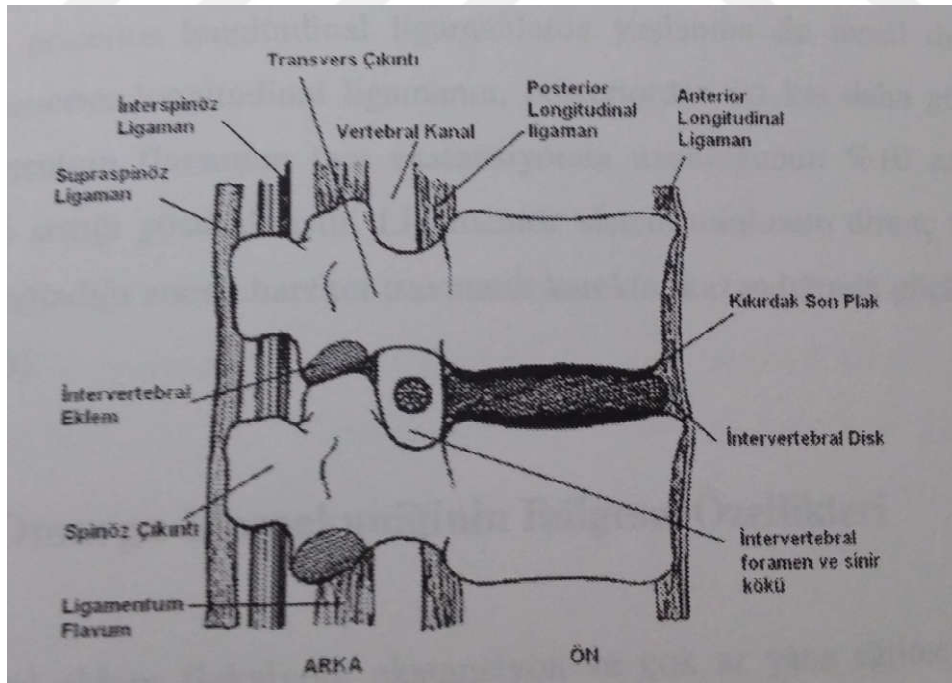
B : Omurganın venöz dolaşımı

2.7.Omurganın biyomekaniği

Omurganın üç esas biyomekanik fonksiyonu vardır ; vücut ağırlığının pelvise aktarılması, baş, gövde ve pelvis arasında fizyolojik hareketin sağlanması, spinal kordun korunması(26).

Omurganın biyomekaniği son derece karmaşıktır. Omurganın biyomekaniğini anlamak için hareket segmenti tanımını yapmak ve fonksiyonlarını bilmek gerekir (24). İki komşu vertebra ve yumuşak dokular birlikte hareket segmentini oluşturur. Her hareketli segment üç eklemden oluşur; intervertebral disk ve faset eklemler(27).

Aşağı doğru inildikçe vertebra korpusunun büyüklüğü ve strese karşı koyma yeteneği giderek artar (28). Yükün taşınması korteks ve spongioza tarafından sağlanmaktadır. gençlerde iki bölüm arasında basma dayanımı açısından bir farklılık olmadığını fakat 40 yaş üzerinde kortikal kemiğin yükün %65-75'ni taşıdığı bulunmuştur. Spongioz kemik şok absorpsiyonunu güçlendirdiği gibi trabeküler kemiğin kompresif gücünü de arttırmaktadır (24).



Şekil 8:İki komşu vertebranın oluşturduğu hareketli segment yapısı

Vertebra üzerine binen aşırı kuvvetlerde, uç plakların kırılmaya en uygun bölge olduğu bilinmektedir. Üç temel uç plak yetmezlik biçimi olduğunu gösterilmiştir. Santral kırık dejenere olmamış disklerde, periferik kırık dejenere disklerde, uç plağın tümünü alan kırıklarında daha yüksek güçlerde olduğu saptanmıştır(24).

Posterior elemanları çıkartılmış hareket segmentinde nükleus basıncı ölçüldüğünde, faset eklemlerin hareket segmenti tarafından karşılanan toplam sıkıştırıcı yükün %18'ini taşıdığı bulunmuştur. Faset ve diske binen yükler kadavra çalışmasında ayrıldığında omurga postürüne göre, fasetler tarafından taşınan yükün %0-33 arasında olabileceği gösterilmiştir. Hareket segmentinin torsiyonel gücü incelendiğinde, disk ve longitudinal ligamentlerin taşıdığı yük, iki faset ve kapsüler ligamentlerle eşit olarak %45'er paylaşıldığı ve diğer %10'unun interspinöz ligamentlerle sağlandığı öne sürülmüştür (24,26).

Anterior ve posterior longitudinal ligamanlarda yaşlanma ile tensil dirençlerinde azalma olduğu ve anterior longitudinal ligamanın, posteriordan iki kat daha güçlü olduğu bulunmuştur. Ligamentum flavumun tam ekstansiyonda uzunluğunun %10 azaldığı, tam fleksiyonda ise %35 arttığı gösterilmiştir. Ligamentöz sistem minimum direnç ve enerji ile fizyolojik hareketi sağladığı ancak hareket travmatik karakter kazandığında güçlü bir direniş göstermektedir(24,26).

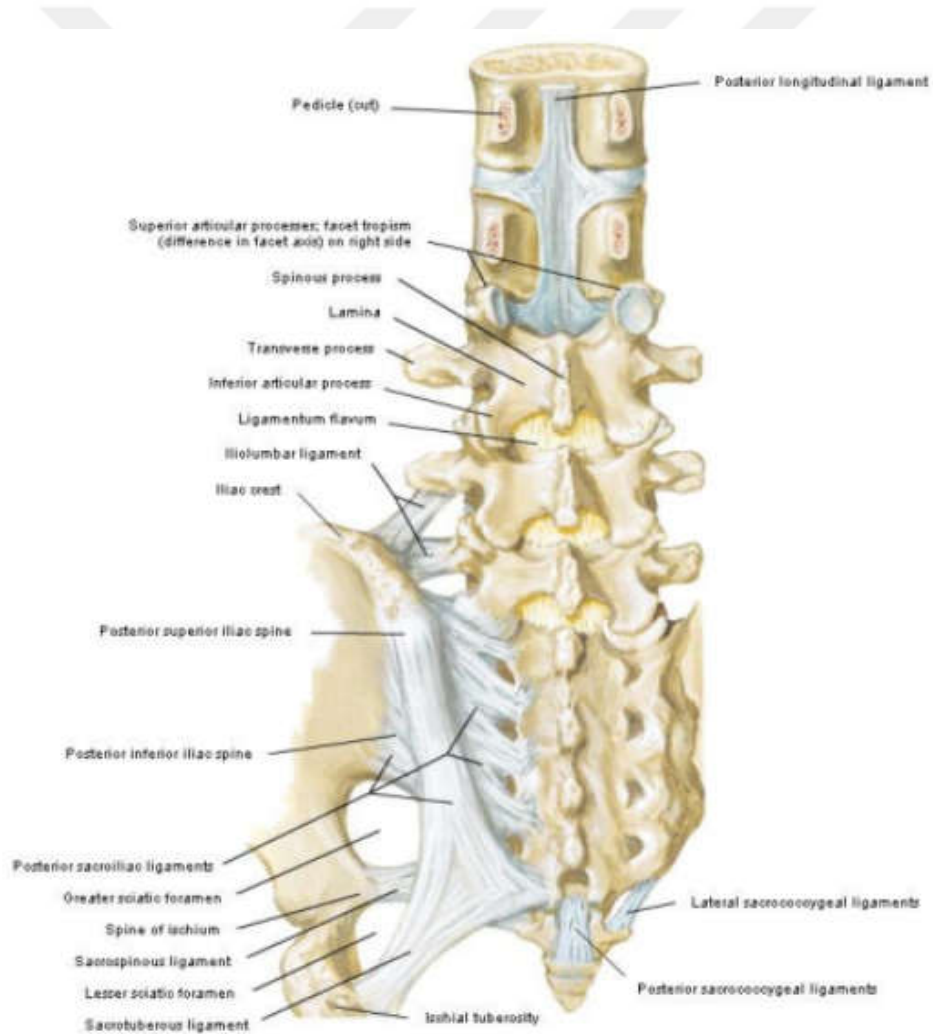
2.7.1.Omurga biyomekaniğinin bölgesel özellikleri

Atlantookspital eklem fleksiyon, ekstansiyon ve çok az yana eğilmeye izin verir. Atlantoaksiyal eklem ise sadece çok az eğilme ve rotasyona izin verir(28). Tüm servikal bölgenin rotasyonel hareketinin yarısı atlas ve aksis arasında, geri kalan hareket ise subaksiyel vertebralarda meydana gelir. Servikal fleksiyonun yaklaşık yarısı yine atlantookspital eklemlerde oluşmaktadır. Servikal vertebranın nötral pozisyonu ekstansiyondur, tam ekstansiyon ve fleksiyon arasında açı ortalama 91 derecedir (26,28). Torakal bölge vertebraları sternum ile bağlantılı kostalar tarafından hareketleri çok kısıtlanır. Torakolomber bileşkede göğüs kafesi artık destek sağlamazken, omurganın torakal kifotik eğriliği ve bu bölgenin alt bölgelere göre korpus büyüklüğünün daha az olması kırıkları kolaylaştırır(28).

Lomber bölgede faset eklemleri sagittal planda olmaları nedeniyle fleksiyon, ekstansiyon ve lateral fleksiyona izin verirken, rotasyonel hareketler ise kısıtlanmaktadır(26). Lumbosakral bileşkede eklemler tek bir eklem gibi çalışır. Beşinci

lomber vertebra sakrum ile eklem yapabilmek için eklem yüzü öne ve hafifçe aşağı doğru dönük olması nedeni ile diğer lomber vertebralardan ayrılır. Bu pozisyon ile rotasyon mümkün olabilir, ancak iliolumbar ligamanlar varlığı harekete fazla izin vermez. Ayrıca lumbosakral eklemin nispeten dik oryantasyonu, eklemden kayma riskini oluşturur.

Hareketli segmentin fleksiyon/ekstansiyon için hareket açıklığı C5-6'da 20 derece iken, L5-S1 eklemden 17 derecedir. Lateral fleksiyon en fazla servikal bölgede 9-10 derece iken lombar bölgede 6 derece, L5-S1 eklemden sadece 3 derecedir. Spinal rotasyon C1-C2'de 12 dereceye kadar çıkabilmekte ancak üst torakal 9 derece ve lombar bölgede 2 dereceye düşmektedir(26,27).



Şekil 9 : Processus articularis'lerin oluşturduğu faset eklem, posterior longitudinal ligaman, intervertebral disklerin, ligamentum flavumun, sakroiliak ve iliolumbar ligamanların arkadan görünüşü

2.7.2.Omurga kaslarının biyomekaniği

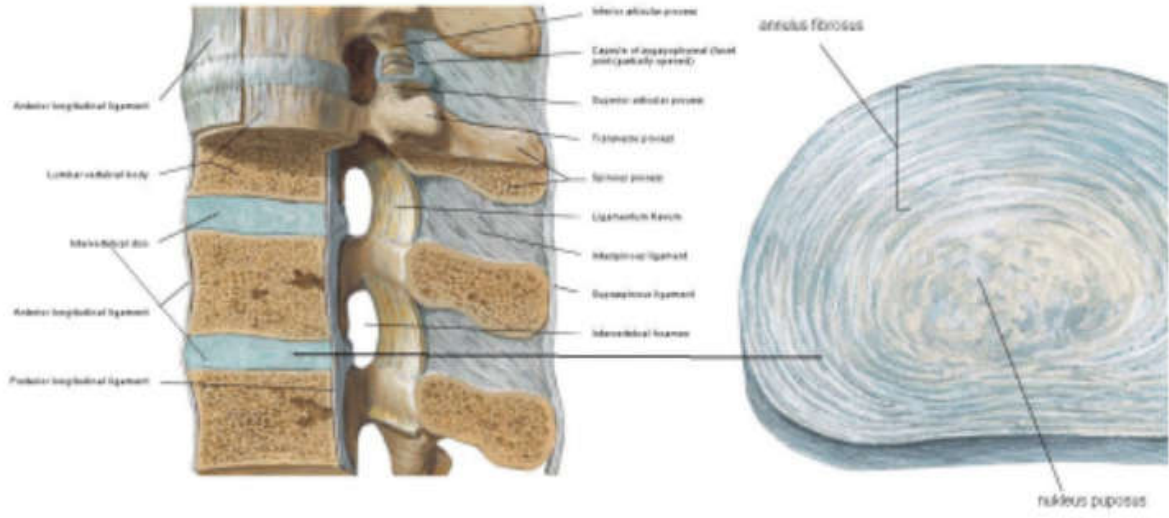
Ligamentleri sağlam ancak kaslardan yoksun omurga son derece dengesiz bir yapı olur. Öne eğilme hareketinin ilk 60 derecesi lomber hareket segmentinin fleksiyonuna bağlıdır. Buna kalça eklemının ek 25 derecelik fleksiyonu eşlik eder. Fleksiyon ve nötral pozisyondan tam ekstansiyona geçiş sırasında çoğu sırt kaslarının inaktif olduğu görülmüş, buna karşılık abdominal kasların aktif olduğu saptanmıştır.Lateral eğilmede,lomber bölgenin kontralateral tarafında ve torasik bölgenin ipsiletiral tarafında daha yüksek aktivite izlenmiştir.Aksiyel rotasyon sırasında sırt kaslarının simetrik aktivite gösterdiği,lomber kas aktivitesinin ise sadece kontralateral bölgede bulunmuştur.Karın kasları ise az bir aktivite gösterirken, glutes medius ve tensor fasya lata kasları güçlü aktivite içinde bulunmuştur(24).

2.7.3.Disk biyomekaniği

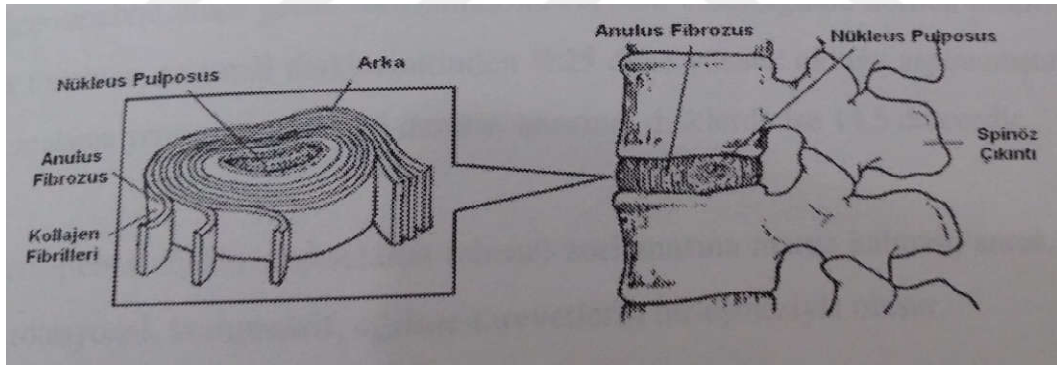
Disk vertebral kolonun % 20-33 'ünü oluşturur.İntervertebral disk destek sağlar ve şok absorbsiyonu yapar.Üç bölümden oluşur; nükleus pulposus,anulus fibrozus ve kıkırdak yapıdaki uç plak (26).

Diskin kesiti incelendiğinde kollojen,proteoglikanlardan oluşan ve % 70-90 oranında su içeren jelatinöz yapıda nükleus pulposus tüm diskin %30-50 'ini oluşturur. Nükleusun etrafını çevreleyen anulus fibrozus tabakaları yatayla 30 derece ,birbirleriyle 120 derece açı yapacak şekilde yönlenmiş kollajen lifler içerir.Anulusun iç kısmında ise intervertebral disk kompleksinin majör yük taşıyıcı kısmı olan fibrokartilajinöz doku bulunmaktadır.Anulus fibrozus iç liflerle kartilajinöz uç plağa,Sharpey lifleri ile de vertebra korpusunun duvarındaki kortikal kemiğe tutunmaktadır.(26,27,28)

A



B



Şekil 10 A : Lomber bölgede diskus intervertebralis ve komşu vertebra korpusları ile ilişkisi, median kesit. **B :** İntervertebral diskin iç yapısı

Oturma pozisyonunda disk üzerine gelen kompresif yüklerin, vücut ağırlığının 2-3 katından daha fazla olduğu saptanmıştır.Disk ayrıca öne ve arkaya eğilme sırasında gerilme streslerinin etkisi altında kalmaktadır.

İntervertebral diskin kompresif düşük yüklere çok az direnç gösterdiği ,fakat yük artmasıyla sertleştiği ortaya çıkmıştır.O halde disk az yüklerde fleksibilite sağlarken ,büyük yüklerde stabilite sağlar.Yapılan çalışmalarda yükün çoğunun nükleus pulposus tarafından taşındığı saptanmıştır.

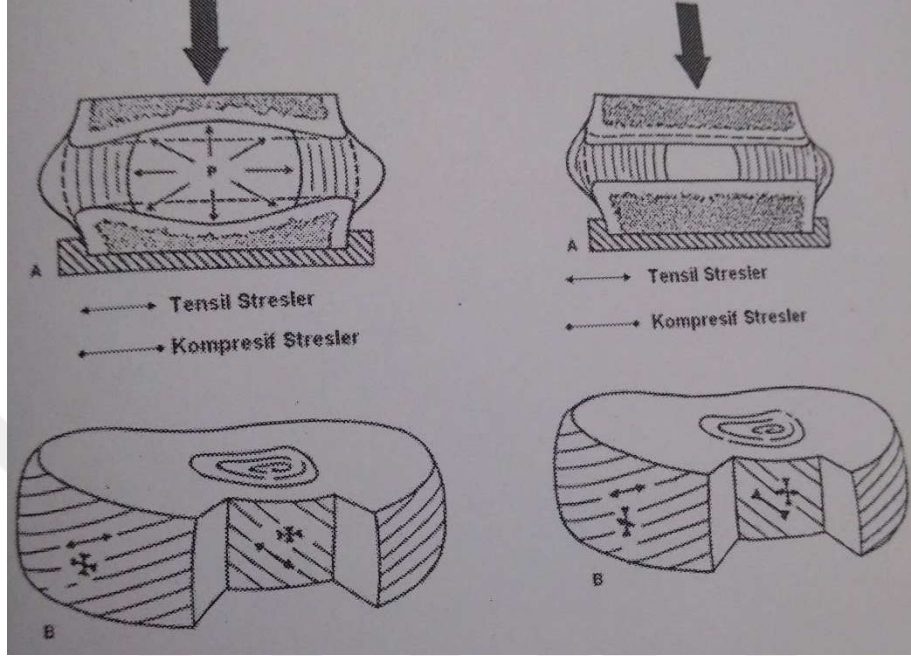
Genel olarak disk gerici kuvvetlere karşı ön ve arka bölgelerin yanlardan daha güçlü olduğu ve nükleus pulposusu içeren merkezin en zayıf alan olduğu saptanmıştır(24).

Deneyisel veriler eğilme ve torsiyon yüklerinin intervertebral diske en çok zarar veren yükler olduğunu göstermiştir.Sagittal ve frontal düzlemlerdeki 6-8 derecelik eğilmeler disk yetmezliği ile sonuçlanmaz.Ancak arka elemanların çıkarılması ve 15 derecelik eğilme ile yetmezlik oluşur.Diğer sonuç ise diskin içinde nükleus pulposusun , yüksek basınçlı yerden düşük basınçlı yere hareketi ve tersi olarak anulus fibrozusun ise en çok stresin uygulandığı yere taşmasıdır.Ayrıca disk kompresyon sırasında kabarır,gerilme sırasında ise büzülür(24,28).

İntervertebral diske gelen rotasyonel kuvvetlere bakıldığında normal diskin ortalama yetmezlik torkunun , anormal disklerinkinden %25 daha yüksek olduğu saptanmıştır.Normal disklerin ortalama yetmezlik açısı 16 derece, anormal disklerde ise 14,5 derecedir.

İntervertebral diskin makaslama (shear) zorlamasına maruz kalması, ancak kendisine uygulanan rotasyonel , kompresif eğilme kuvvetlerin birleşmesiyle oluşur.

Normal intervertebral disklerin , dejenere intervertebral disklerle göre daha yavaş şekil değiştirdiği ve daha viskoelastik olduğu bulunmuştur.Dejenerasyonun , diski daha az viskoelastik yaptığı ve şokları yumuşatma ve yükleri uç plakların tümü üzerine eşit bir şekilde dağıtma yeteneğini ortadan kaldırdığı görülmüştür (24).



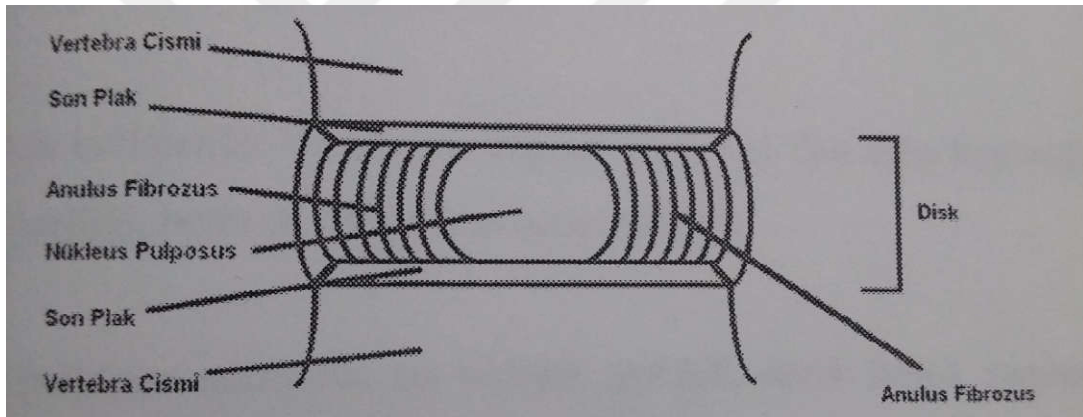
Şekil 11:Normal intervertebral disk (A) ve dejeneratif intervertebral diskin (B) strese karşı davranışı

İntervertebral disklere uygulanan yükün ortadan kalkmasıyla visko elastik yapı eski şekline dönerken , aldığı enerjinin bir kısmını kendinde tutar(Hysteresis).Bu şok absorbsiyonu uygulanan yüke, diskin yaşına,disk düzeyine göre değişir.Ayrıca ikinci bir yüklenme ile şok absorbsiyonu azalır , buna dayanarak insanların tekrarlanan yüklere karşı daha az korunduğu düşünülür (24).

2.8.Disk anatomi ve fizyolojisi

Vertebra cisimlerini birbirine bağlayan oluşumlara intervertebral disk denir. İntervertebral diskler ; kıkırdak yapıdaki uç plak, anulus fibrosus ve nükleus pulposusdan oluşurlar.

Kıkırdak yapıdaki uç plak, hyalen kıkırdak tabakasından oluşmuş olup komşu vertebraaların disk boşluğuna bakan yüzeylerine porlu kalsifiye kıkırdak ile sıkıca tutunmuşlardır. Bu delikli tabaka Lamina kribrosa olarak adlandırılır. Diskin beslenmesi bu porlar yoluyla olur. Disk dışta anulus fibrozus ve içerde nükleus pulposus'tan oluşur. Disk aralığı üstte ve altta kıkırdak plaklar ile sınırlanmıştır (28).



Şekil 12: Disk anatomisi

Kıkırdak plaklar , hyalin kıkırdak içerir ve korpus yüzeylerini sarar. Esas rolü korpus ve nükleus pulposus arasında biyomekanik ve metabolik geçiştir. Kıkırdak yapı doğumda çok sayıda vasküler yapı içerirken , erişkinde daha çok avasküler yapıdadır. Kıkırdak plak genellikle orta bölgede ortalama 0.6 mm incelme gösterir. Kıkırdak yapının içeriği , komşu iç anulusa benzer. Bu özellik glikoz, oksijen gibi besinlerin diffüzyonla geçebilmeleri için düşük direnç sağlar. Böylece diskin beslenmesi , kıkırdak yapı ve anulus arasındaki solüsyon transportu ile sağlanır (29,30).

Anulus fibrozus, nükleus pulposusu sınırlayan kapsüldür. Fibrillerin dağılımı sayesinde kompresif , torsiyon ve fleksiyon güçlerine karşı koyar. Anulus fibrozus, gençlerde

% 80 su içerir. Predominant olarak periferik anulusta tip 1 kollajen , iç anulusta ve nükleus pulposus'ta tip 2 kollajen fibrilleri bulunur. Ek olarak diskte çeşitli derecelerde tip 3,5,6,9,11 kollejenlerde bulunur. Ayrıca iç anulus , periferik anulustan daha yüksek proteoglikan ve daha az kollejen içerir. Sharpey lifleri vertebral korpuse , iç bölgenin liflerinin kıkırdak yapıya bağlanmasından daha kuvvetli yapışır.Bu özellikler sayesinde dışta tensil kuvvetlere karşı direnmeyi sağlarken , içte kompresif güçlere karşı koruma sağlanır. Histolojik olarak baktığımızda periferik anuler hücreler tendondaki fibrositler gibi iğsi yapıda, iç anuler hücreler ise yuvarlak kondrositlere benzer. Bu hücreler esas olarak proteoglikan içeriğini ekstrasellüler matriksten alır ve proteoglikan sentezi daha çok orta anulus bölgesinden olur. (31,32,33)

Disk içinde kollajenler karşılaştırıldığında tip 2 , tip 1'den daha hidratedir. Bu kovalent çapraz bağların özelliği , belki de bir çok davranışı belirler.Nükleus pulposus normalde iyi hidrate , gevşek , nazik fibröz yapıların oluşturduğu kompresif yapıda olmayan jelatinöz matriksten oluşur.Matriks , kollajen ve proteoglikanlardan (kondritin-6 sülfat, keratan sülfat , hyaluronik asit ve kondritin -4 sülfat gibi)oluşur (29).

Nükleus pulposus 'un su içeriği yaşla birlikte giderek azalır . Hatta su içeriği sabahdan akşama kadar da değişir .(34) Bu değişiklik ağırlık taşımaya yanıt anlamına gelir. Bu özellik disk fizyolojisi üzerinde hidrostatik basıncın var olduğunu gösterir ve bu basınçta dik durumda çevre dokuların basıncından birkaç kat daha büyüktür. Disk kaybettiği suyu tekrar kazanmak için diskin içindeki makromoleküllerin oluşturduğu osmotik basıncı kullanarak absorpsiyon kapasitesini artırır . (28,32)

Yetişkin insan diskinde sinir yapıları bulunmaz. Dejenerasyon sonucunda oluşan ağrı hissi büyük olasılıkla çevre dokuların biyomekanik değişiklikleri sonucu oluşur . (32) Ağrının hissedilmesinde vertebra, ligamentler, fasya,kaslar,faset eklemler ve intervertebral disk rol oynamaktadır.İntradiskal patoloji ağrı oluşmasında majör rol oynar. Burada ağrı oluşturan sensitif sinir sonlanmaları , anulus fibrozus 'a hatta dejenere diskin iç bölümüne kadar uzanabilir. Ayrıca nükleus pulposus inflamatuvar özellikleri bulunan bir dokudur . (35,36,37)

2.9.Disk dejenerasyonu ve patofizyolojisi

Diskin biyokimyasal ve yapısal değişikliği zaman içerisinde olan normal bir fenomendir .(29) Yaşlanma sırasında kıkırdak yapıda incelme ve hyalin kıkırdak artışı olur.Kıkırdak yapıdaki deformasyonun iyileşmesi sırasında oluşan kallus dokusu disk beslenmesinde azalmaya yol açarak,muhtemel dejenerasyona götürür.(29,32)

Yaşlanmayla disk proteinlerinin kompozisyonu değişir, bunun sonucu olarak da özellikleri değişir. Kollajen üçlü heliks konfigürasyonuna sahip protein ailesinin ortak adıdır. Kollajenin gerilim gücü diskin vertebra korpuslarına sıkıca tutunmasına ve makaslayıcı güçlere dayanmasına olanak verir. Ama kollajenin kompresif güçlere dayanma özelliği yoktur. Ayakta dururken aksiyel iskelet önemli miktarda kompresif yüklenmeye maruz kalır. Vertebra korpusları kemik trabeküllerinin yapısı sayesinde bu kompresif güçlere dayanabilirler. İntervertebral diskler ise bu kompresif güçlere matrikslerinin osmotik özellikleri sayesinde dayanırlar. Bu osmotik özellikleri proteoglikanların yapıları sağlar.İntervertebral diskte bulunan proteoglikanlar çeşitlidir, ama hepsinin ortak bir özelliği vardır; merkezlerinde hyaluronik asitten oluşmuş bir çekirdek vardır. Bu çekirdeğe glikozaminoglikandan oluşmuş yan zincirler tutunur. Bu yan zincirler elektriksel yükü negatif olan asidik gruplar içeren kondroitin sülfat ve keratin sülfat proteinlerinden oluşmuşlardır.

Diskin içerisinde az miktarda, disk matriksinin idamesinde önemi olan konnektif doku hücreleri ve bunların yanısıra proteazlar ve kollogenazlar da bulunur. Araştırmalar proteoglikanların yavaş ama devamlı sentezini göstermektedir. Bu da disk matriksinin kondrositler tarafından devamlı olarak bir sentez ve tamir içerisinde olduğunu göstermektedir. Bu metabolik aktivite kondrositlere beslenmenin, yani glukoz ve oksijenin sağlanması ile mümkündür. Erişkinlerde disk avaskülerdir ve besinler diffüzyon yolu ile hücrelere sağlanmalıdır. Maddelerin diffüze olabilecekleri 2 ana yol vardır: End plateler ve anulusu çevreleyen kapillerler. Bu diffüzyona etki eden faktörler porların büyüklüğü ve ilgili maddelerin konsantrasyon gradyanlarıdır. Bunlara ek olarak ozmotik etki sonucu sıvı pompalanmasına bağlı devamlı bir akış da vardır. Tahmin edilebileceği gibi kondrositlerin metabolizması temel olarak anaerobiktir.

Yaşlanma ile tip 2 kollajen anulusun dış tarafında artış gösterir ve nükleus pulposus 'un su kaybı,anulustan daha fazladır.Diskin hidrostatik özelliklerinin azalması ile her iki bölgede hidrasyon % 70 oranlarına iner.(29)

Proteoglikanların kimyasal yapısı dejenerasyon ile değişiklik göstermez fakat içeriği değişir .Keratan sülfat ,kondritin sülfat oranı artar fakat burada kollajen fibrillerin ilişkilerinde farklılaşma ve tensil kuvvetlerinde azalma olur.Nükleus pulposus 'un su taşıma kapasitesinde azalmanın , proteoglikan komplekslerin ağırlığında azalma ile ilişkili olduğuna inanılmaktadır. Proteoglikan komplekslerin olması diskin sağlıklı olduğunun belirtisi olabilir ve dejenerasyon ile düşüş görülebilir (29).

Disk progresif olarak fibrozis ve disorganize olmakta vesonunda amorf fibrokartilaj olarak görülmekte ve nükleus pulposus ile anulus fibrozus arasında sınır açıkça seçilememektedir.(29)

Disk herniasyonu ve disk dejenerasyonunu takiben vertebranın diğer yapılarında sekonder değişiklikler görülür. Disk dejenerasyonu olması disk yüksekliğinde azalmaya ve faset eklem üzerindeki güçlerin artışı malalignmenta yol açar. Faset ekleminde biyomekanik güçler artışı, eklem gevşemesiyle instabilite artışına ve artritik değişikliklere yol açar. Bunun sonucunda kırıklar ve posterior ligamanlarda hipertrofi oluşabilir (29)

Disk dejenerasyonu , protein ile polisakkarit arasındaki balans değişikliğinin olması ile başlar (depolimerizasyon) . Depolimerizasyonun artışı , nükleusun su yakalamasını arttırır ve intradiskal basınçta artış görülür. Basıncın kalıcı olarak yüksekliği disk aralığının daralmasına, anulusun ve faset eklem kapsülünün gerilmesine neden olur. Bunun sonucunda dejenerasyon gelişme süreci hızlanır.(28,32)

Diskin dehidrate olması sonucunda destek olarak iş görme yeteneği azalır. Kıkırdak plaklarda fissürlere ve internal herniasyona yol açar.(Schmorl Nodülleri) Diskte gaz birikimi olur.(Vakum Fenomeni)

Anulus fibrozusun taşması ile sharpey liflerinin yapıştığı yerdeki periostun ayrılması, subperiostal kemik reaksiyonuna yol açarak osteofit oluşumuna neden olur. Osteofitler anterior veya lateral yönde oluşurken, disk herniasyonları posterolateral lokalizasyonda oluşur.(28)

2.10.Disk dejenerasyonuna yol açan risk faktörleri

Disk dejenerasyonunun sebepleri henüz tam olarak bilinmemektedir. Multipl faktörlerin etkili olduğu düşünülmektedir; otoimmün, genetik reabsorbsiyonda bozukluk ve biyomekanik olaylar dejenerasyona yol açabilir. (29)

Fiziksel aktivite , immobilizasyon, vibrasyon, spinal deformite, sigara içme, vasküler hastalıklar ve diyabet disk dejenerasyonunun başlaması ve ilerlemesine katkıda bulunur.(38, 39)

Skolyozlu hastalarda konkav ve konveks eğrilik bölgesinde tip 1 ve tip 2 kollajen miktarları farklı bulunmuştur . Ek olarak skolyotik disk ve normal disk karşılaştırıldığında içlerindeki glikozaminoglikan miktarlarında ve kollajen çaprazlaşmasında farklılık gösterilmiştir .Matriks metalloproteinaz (MMP 2, MMP 9) miktarının artması , skolyozlu hastalarda disk dejenerasyonu oluşmasına katkıda bulunduğu saptanmıştır.(40)

Cinsiyet ve ileri yaş disk dejenerasyonu oluşmasını etkileyen diğer faktörlerdir. Miller ve ark. 600 kadavra üzerinde lomber disk dejenerasyonu incelendiğinde ,disk dejenerasyonu erkeklerde ikinci dekatta kadınlarda ise üçüncü dekatta başladığını görmüştür.Erkeklerde genel olarak fazla dejenerasyon görülmekle birlikte yaşamın üçüncü ve dördüncü dekatında önemli bir farklılık kalmamaktadır.(41)

2.11.Proinflamatuvar mediatörler

Proinflamatuvar mediatörler , bakteriyel ürünler, immün kompleksler, fiziksel incinmeler ve çeşitli inflamatuvar olaylarla artan polipeptid yapıda moleküllerdir .Bu inflamatuvar yanıt olmadan yaşam sürdürülemez.Çok sayıda proinflamatuvar mediatör mevcut olup başlıcaları lökotrienler, prostoglandinler,interlökinler (IL) ,Tümör Nekroz Faktor α (TNF α), Nitrik oksit (NO),Tissue inhibitör of metalloproteinases (TIMP 1) ve Matriks metalloproteinaz (MMP)'lardır.

IL-1 ; α ve β olmak üzere iki homolog molekülden oluşur ve bu moleküller aynı reseptöre bağlanmaktadır. IL-1 β 'nın ana kaynağı; TNF α gibi aktive mononükleer fagositlerdir. Ayrıca nötrofiller, epitelyal hücreler ve endotel hücreleri tarafından da sentezlenir. Dolaşımda en çok IL-1 β bulunmaktadır. Düşük konsantrasyonlarda lokal inflamasyon mediatörüdür.(42,43) IL-1 β , kollagen doku üzerine etki ederek osteoklastik aktiviteyi artırır ve böylece kemik turnoverinin artmasına neden olur. Osteoblastlarda ise

alkalen fosfataz aktivitesini arttırır. IL-1 (IL-1 α ve IL-1 β) ; siklooksijenaz-2 (COX2), fosfolipaz A2, kollejenaz ve nitrik oksit sentaz (NOS)'ın aktivatörüdür. IL-1 aynı zamanda araşidonat kaskadını ve kinin sistemini aktive eder. Karaciğerden akut faz proteinlerinin salınımını artırır ve yangısal reaksiyonları destekler.(44-47)

IL 6; IL-1 β gibi doğal immünitede yer alır. Mononükleer fagositler,fibroblastlar ve vasküler endotelial hücrelerden sentezlenir.Hepatositlerden akut faz reaktanlarının sentezlenmesini,kemik iliğinden B lenfosit ve nötrofil yapımını arttırır.(48) B lenfositlerinin immunglobulin salınımı için bir kofaktör olarak rol oynar. Yani B lenfositlerinin ayrışım sıralamasının geç dönemlerinde B lenfositleri için büyüme faktörü olarak rol oynar. Benzer şekilde malign plazma hücreleri için de (plasmositoma ya da myelom) büyüme hücresi rolü oynar ve kendi kendine büyüyen plazmasitom hücreleri otokrin büyüme faktörü olarak IL 6 salgılar (49,50).

Nitrik oksit, nitrojen atomu ile moleküler oksijenin reaksiyona girmesi sonucu oluşan kısa ömürlü bir serbest radikaldir. Nitrik oksit sentaz enzimi vasıtasıyla L-argininden oluşur. Nitrik oksit sentaz enziminin iki ana sınıfı vardır. Yapısal izoformları endotelial hücreler ve noronlarda, uyarılabilir izoformu ise makrofajlarda bulunur. Vasküler sistemde, endotelial hücrelerden salınan nitrik oksit vazorelaksasyon oluşturur, trombosit agregasyonunu ve nötrofil infiltrasyonunu inhibe eder. NO'nin çok yüksek konsantrasyonlarda endotel hücreleri, düz kas hücreleri, hepatositler ve fibroblast gibi çok farklı hücre tiplerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu ve poliaminlerin sentezinde görevli ornitin dekarboksilaz enzimini inhibe ederek hücre proliferasyonunu azalttığı gösterilmiştir.(51)

TIMP'lerin bilinen ilk biyolojik fonksiyonu keşfedilmelerine sebep olan kollajenaz inhibisyonudur.(52) Mononükleer fagositler, nötrofiller ve dendritik hücreler TIMP ve MMP üretebilme yeteneğine sahiptirler. (53,54,55) TIMP'ler ekstraselüler matrikste MMP'lerle 1:1 oranında non-kovalent stokiometrik kompleksler şeklinde bulunurlar. TIMP 1; epitelyal hücrelerde ve B lenfositlerinde apoptozisi azaltır.(56,57) TIMP 2'de melanoma hücre dizilerinde apoptozisi inhibe eder.(58) TIMP 3 basit retinitis pigmentosada retina hücrelerinde apoptozisi uyarır.(59) TIMP'lerin apoptozis üzerine direk ya da indirek etkinlikleri hücre tipine özeldir.(60)

Matriksinler olarak da adlandırılan matriks metalloproteinazlar ekstrasellüler matriks ile bazal membran komponentlerini parçalama yeteneğine sahip olan ve aktif bölgesinde çinko içeren, kalsiyum bağımlı homolog bir enzim ailesidir (61).MMP'lar; proteinazların 5 alt sınıfından biri olan metalloproteinazlar enzim ailesindendir. Büyük çoğunluğu bağ dokusu hücreleri ve mononükleer fagositler tarafından salınmaktadır. Kollajen tip I, II, III, VII, ve X gibi fibriler kollojenlerin yıkımından sorumludurlar. MMP' lar doku yeniden yapılanması, morfogenezis, yara iyileşmesi ve normal gelişimsel süreç gibi fizyolojik durumlarda önemli rol oynadıkları gibi tümör hücresi invazyonu, anjiyogenez ve metastaz gibi patolojik süreçlerde de yer alırlar(61-67) .



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Projemizin hayvan manüplasyonları kısmı ; Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alındıktan sonra, Dokuz Eylül Üniversitesi Multidisipliner Laboratuvarları Deney Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmamızda kullanılan 24 adet Yeni Zelanda Albino suşu erişkin dişi tavşan 6'şarlı 4 gruba ayrıldı. Grup A (Sham grubu) : Dorsal cerrahi girişim yapılan ancak disk hasarı oluşturulmayan, füzyon yapılmayan grup. Grup B : Dorsal cerrahi girişim ile disklere hasar verilen ancak füzyon yapılmayan grup. Grup C: Dorsal cerrahi girişim ile disklere hasar verilen ve vertebral füzyon yapılan grup. Grup D: Dorsal cerrahi girişim ile disklere hasar verilen, vertebral füzyon yapılan ve füzyon sonrası uzun dönem sonuçları değerlendirmek için ' C ' grubundan 4 hafta sonra kurban edilen grup. Denek temini , materyal temini ve cerrahi işlem uygunluğu yönünden tavşan seçildi. Bu çalışmanın cerrahi bölümü , tavşanların barındırılması, tavşanların kurban edilmesi ve disklerin alınması işlemi 'Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı Usul ve İşleyiş Esasları ' doğrultusunda yapıldı.



Resim 1 :Yeni Zelanda Albino Cinsi Tavşan

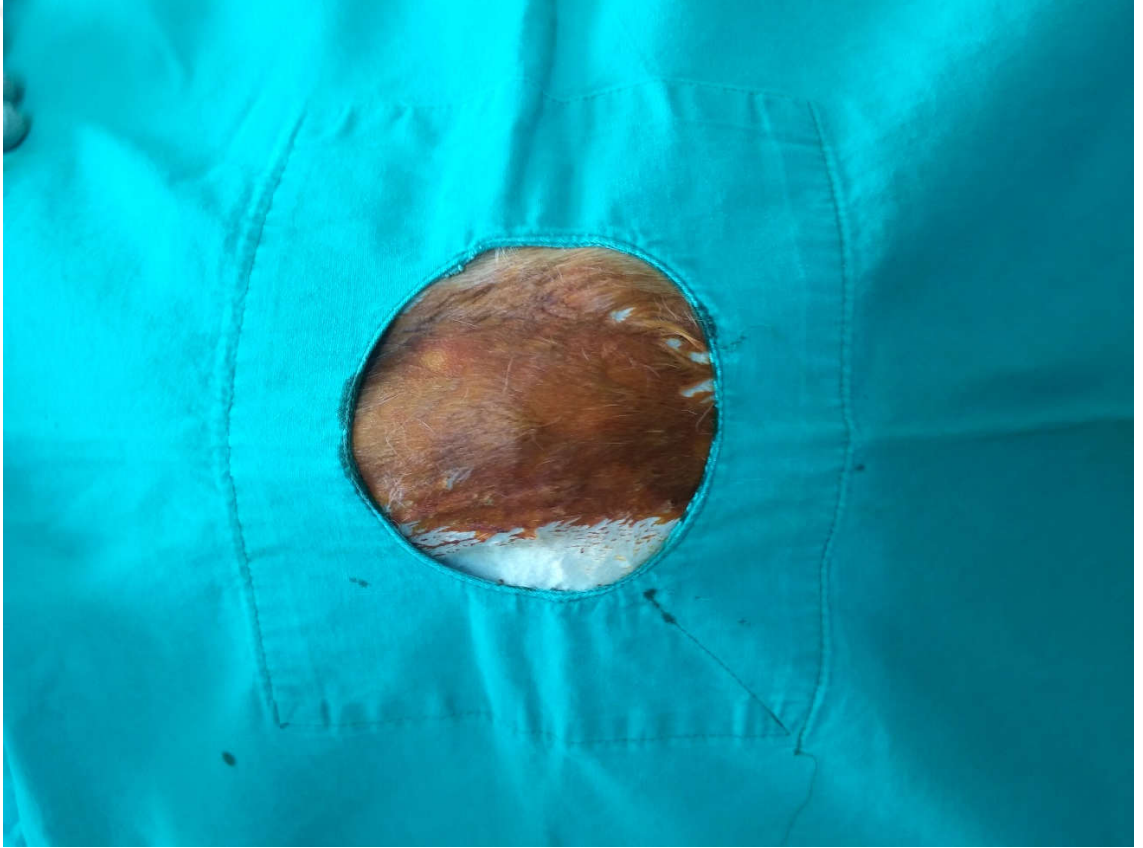
Çalışmamız ; Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında konvansiyonel olarak üretilen 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık siklusunda, ortam sıcaklığının 16-22 °C, %50-60 nisbi nem, saatte 5-15 hava değişiminin olduğu standart laboratuvar koşullarında bulundurulan ,her biri 3-3,5 kilogram ağırlığında 24 adet erişkin dişi Yeni Zelanda albino cinsi tavşanda yürütüldü. Tavşanlar, odalar arası adaptasyon için 1 hafta kullanım alanında bekletildi, 2'şerli olacak şekilde standart kafeslerde barındırıldı ve çalışma boyunca ad-libitum 3 mm pelet yem ve taze içme su ile beslendi.



Resim 2 : 2'şerli standart kafesler

3.1 Cerrahi Öncesi Hazırlık

Genel anestezi indüksiyonunda ; Ketamin (Ketalar 50 mg/ml, pfizer) 35 mg/kg dozunda ve Ksilazin (Alfazyne %2 20 mg/ml , Egevet) 5 mg/kg dozunda, intramuskuler yolla verildi. İdame doz olarak yalnızca ketamin kullanıldı. Anestezi uygulandıktan sonra tavşanlar prone pozisyonuna çevrildi ve lomber bölge savlonla silinerek traşlandı. Tavşanlar operasyon masasındaki bağlarla masaya tespit edildi.Traşlanan bölge povidon-iodin solüsyonu ile silinerek dezenfeksiyon sağlandı.



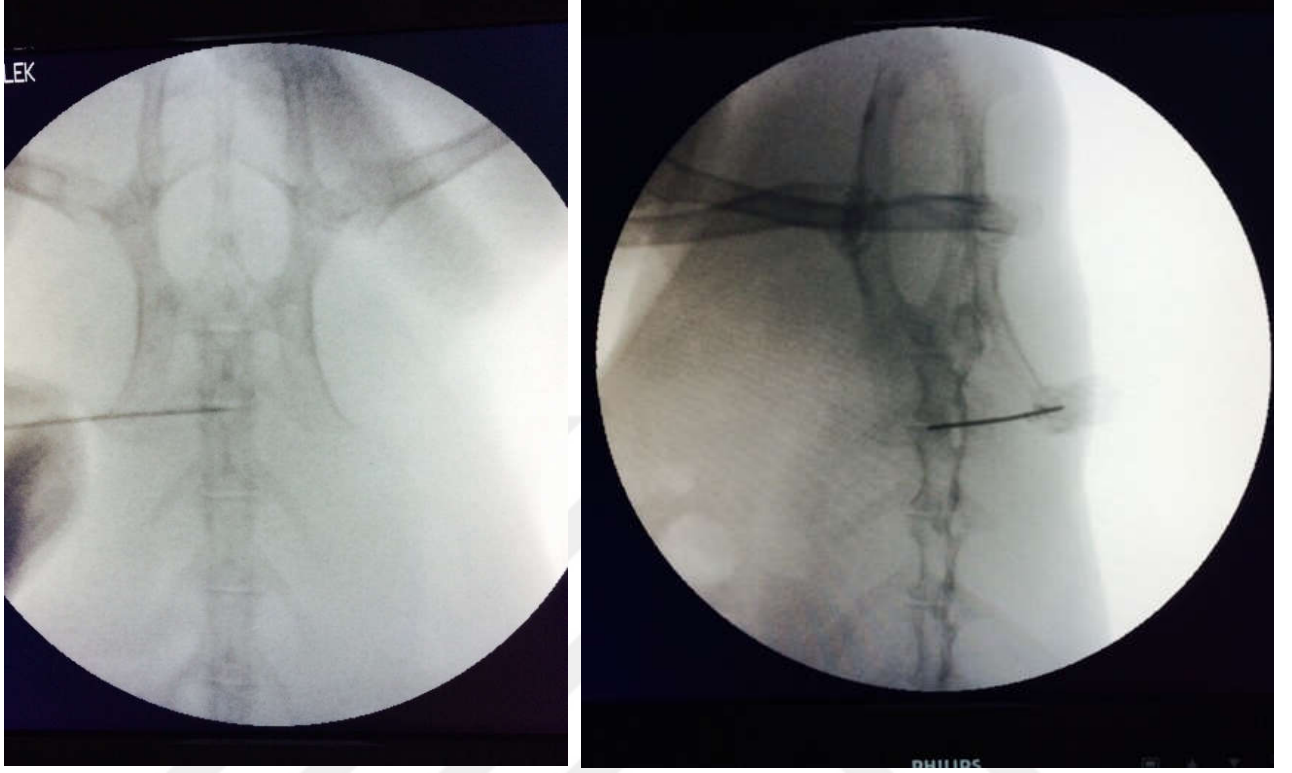
Resim 3 :Cerrahi öncesi hazırlık

3.2 Cerrahi işlem ve gruplar

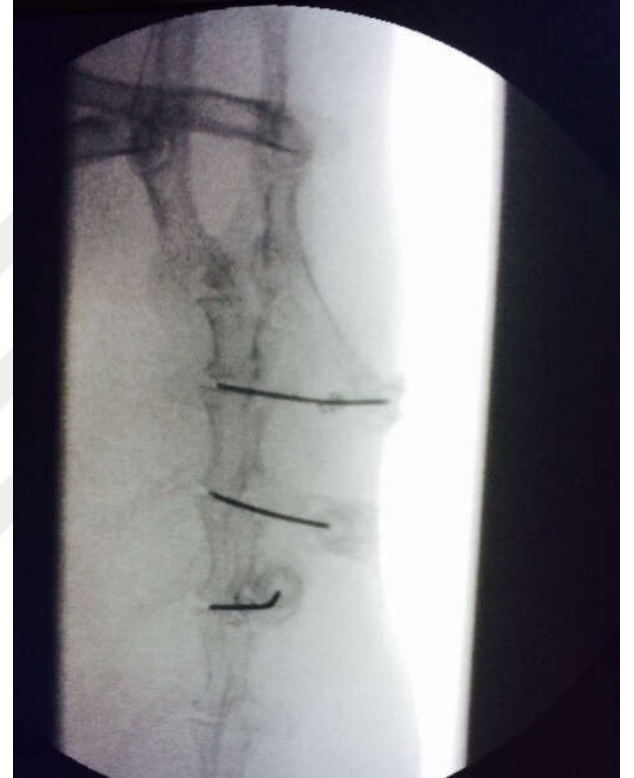
Tüm cerrahi işlemler aynı cerrah tarafından uygulandı. Tüm gruplardaki hayvanlara genel anestezi altında prone pozisyonda dorsal cerrahi girişim yapıldı. Yeni Zelanda Albino cinsi tavşanlarda toplam 7 lomber vertebra bulunmaktadır. İliak kanatları birleştiren çizgi L6-L7 interspinoz mesafeye denk gelir ve bu mesafe diğer lomber interspinoz mesafelerden daha uzundur.(14) Bu klavuz noktalar belirlenerek öncelikle Grup A'daki tavşanlara eşit cerrahi stres oluşturmak amacıyla genel anestezi altında sadece dorsal cerrahi girişim yapıldı. Sırasıyla cilt, ciltaltı , fasya geçildi, paravertebral kaslar diseke edildi, disk dejenerasyonu veya füzyon yapılmadan açılan katlar sırasıyla 2 /0 vikril ve 3/0 prolenele suture edildi. Pansuman yapılarak operasyon bitirildi .

Grup B , C ve D' deki hayvanların alt üç lomber diskinde lateral oblik prone pozisyonda, skopi eşliğinde 18 gauge iğne ucu ile klavuz noktalar ve interspinöz boşluklar palpe edilerek, orta hatta ve ventrale doğru 3-4 cm ilerletilerek delici yaralanma yapılarak hasar yaratıldı.(15) Bu işlem sırasında anteroposterior ve lateral floroskopi görüntüleri sayesinde periosta ya da yumuşak dokulara zarar vermemeye özen gösterildi ve kontrollü bir şekilde sadece L4-L5, L5-L6 ve L6-L7 disklerine hasar verildi. Grup C ve D'deki tavşanlara aynı zamanda alt üç lomber vertebraya 1995 yılında Boden ve ark.'nın tanımladığı posterolateral füzyon modeli temel alınarak dorsal cerrahi girişim yapıldı. Bu iki gruptaki tavşanlara dorsal midline insizyonla bilateral paraspinal transvers proses diseksiyonu, lamina ve spinöz proses dekortikasyonu ve Boden modelinden farklı olarak aynı insizyonla ulaşılan posterolateral iliak kanattan alınan 1-1,5 cm³ lük otogreftin (kemik doku) bu alana yerleştirilmesiyle posterior ve posterolateral spinal füzyon oluşturuldu. (12,16,17,18) Açılan katlar sırasıyla 2 /0 vikril ve 3/0 prolenele suture edildi. Pansuman yapılarak operasyon bitirildi .

Özetle ; Grup A - Sham grubu - (n=6) , Grup B (n=6) : Dejenerasyon (+),Füzyon (-) akut dönem, Grup C (n=6) : Dejenerasyon (+), Füzyon (+) akut dönem ve Grup D (n=6) : Dejenerasyon (+), Füzyon (+) kronik dönem olmak üzere toplam 4 grup oluşturuldu.



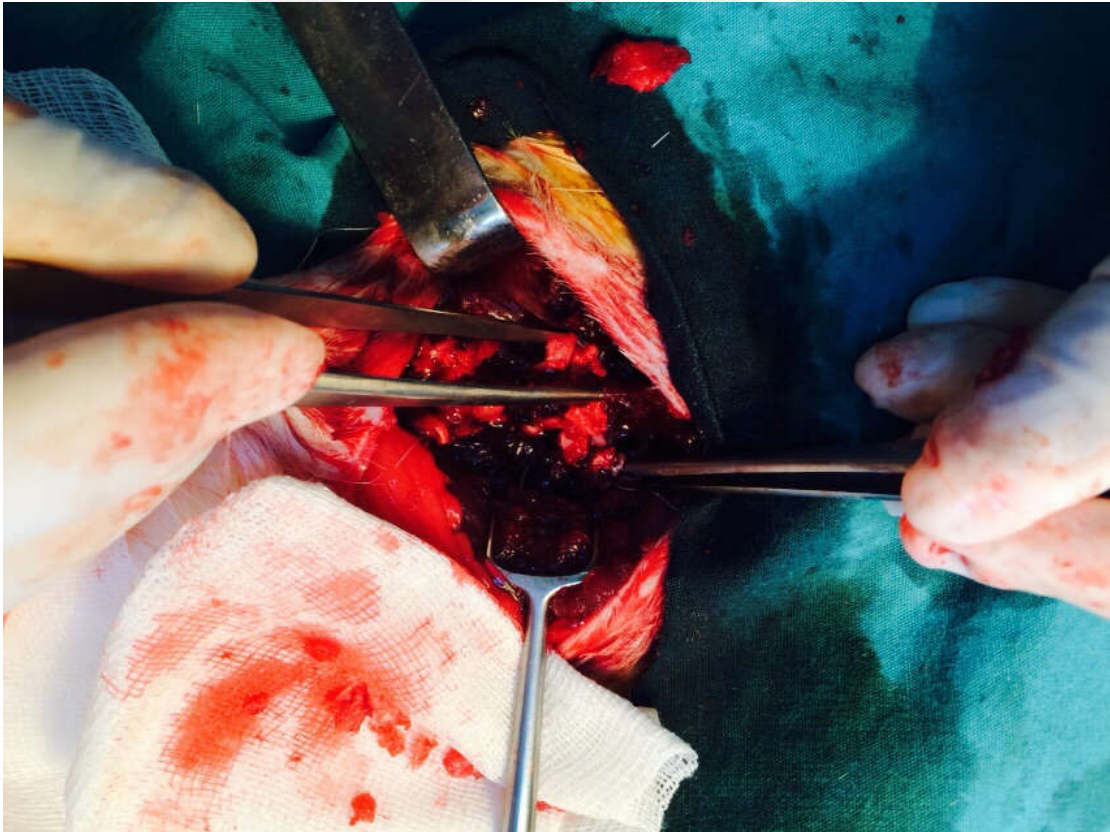
Resim 4 : Dejenerasyonun ilk aşaması olan , L6-L7 diskinin 18 gauge iğneyle dejenere edilmesini gösteren floroskopi görüntüsü



Resim 5 : Toplam 3 seviye dejenerasyonun tamamlandığı , L4-L5, L5-L6, L6-L7 disklerinin 18 gauge iğneyle dejenere edilmesini gösteren floroskopi görüntüsü

Post-op dönemde analjezik olarak Pethidin(Meperidin) (Aldolan, Liba) gerekli aralıklarla, 5-10 mg/kg dozunda subkutan yolla verildi. Her gruptaki deneğe enfeksiyon profilaksisi amacıyla cerrahi öncesi ve postoperatif 2 gün boyunca 1.kuşak sefalosporin (sefazolin sodyum) antibiyotik 50mg/kg/gün dozunda, intramusküler yolla uygulandı.

Deney hayvanlarının araştırmadan çıkarılma kriterleri : Tavşanın beklenen süreden önce kaybedilmesi, sakrifikasyon sırasında omurga ve disk aralığı enfeksiyonu saptanması, cerrahi komplikasyon , parapleji gelişmesi ve/veya bunlara bağlı tavşanların gıda ve su alımlarında azalma, % 20 kilo kaybı olması ve homojenizasyon sonrası doku homojenatından elde edilen materyaldeki total protein konsantrasyonunun 1 mg/ml ‘ nin altında olması şeklinde belirlendi. Çalışma sırasında 4 tavşan yaşanan komplikasyonlar (anestezi komplikasyonlar, kanama) sebebiyle kaybedildi . Bu 4 tavşan çalışmadan çıkarılarak yerlerine ikinci kez etik kurul onayı alınarak yeni 4 tavşan konuldu. Böylece grup sayıları ve toplam sayı korundu.



Resim 6 : Grup C ve Grup D’deki tavşanlara yapılan posterior vertebral füzyon

3.3 Sakrifikasyon

Her tavşan yüksek doz İV. Pentotal (100 mg/kg) ile sakrifiye edilerek diskler alındı. İndeks cerrahi sonrası 1. haftada Grup A, Grup B ve Grup C ‘deki tavşanlar sakrifiye edildi. Hasar ve füzyon oluşturulmuş bir grup ise (Grup D) füzyon sonrası uzun dönem sonuçlarını değerlendirmek için ‘C’ grubundan 4 hafta sonra sakrifiye edildi ve diskler alındı.(13) Gruplardaki değerlendirme sonuçları kontrol grubu ile karşılaştırıldıktan sonra kendi içlerinde de karşılaştırıldı.



Resim 7 : Sakrifiye edilen bir tavşanın Lomber Omurgasının görüntüsü

Resim 8 : L4-L5 , L5-L6 ve L6-L7 disklerinin çıkarılmadan önceki görüntüsü

Tablo 1 : Gruplar ve yapılan işlemleri gösteren tablo

Grup A (Sham grubu) : Dorsal cerrahi girişim yapılmış ancak disk hasarı oluşturulmamış, füzyon yapılmamış deneklerden oluşturuldu.	6
Grup B : Dorsal cerrahi girişim ile diske hasar verildi ancak füzyon yapılmadı.	6
Grup C: Dorsal cerrahi girişim ile diske hasar verildi ve vertebral füzyon yapıldı.	6
Grup D: Dorsal cerrahi girişim ile diske hasar verildi, vertebral füzyon yapıldı ve füzyon sonrası uzun dönem sonuçlarını değerlendirmek için ‘ C ’ grubundan 4 hafta sonra kurban edildi.	6
TOPLAM	24



Resim 9 : Dejenerasyon yapılmayan diskin görüntüsü

Resim 10 : Dejenerasyon yapılan diskin görüntüsü



Resim 11: Grup D ‘ deki bir tavşanın postoperatif 5. Haftanın sonundaki operasyon bölgesinin görüntüsü

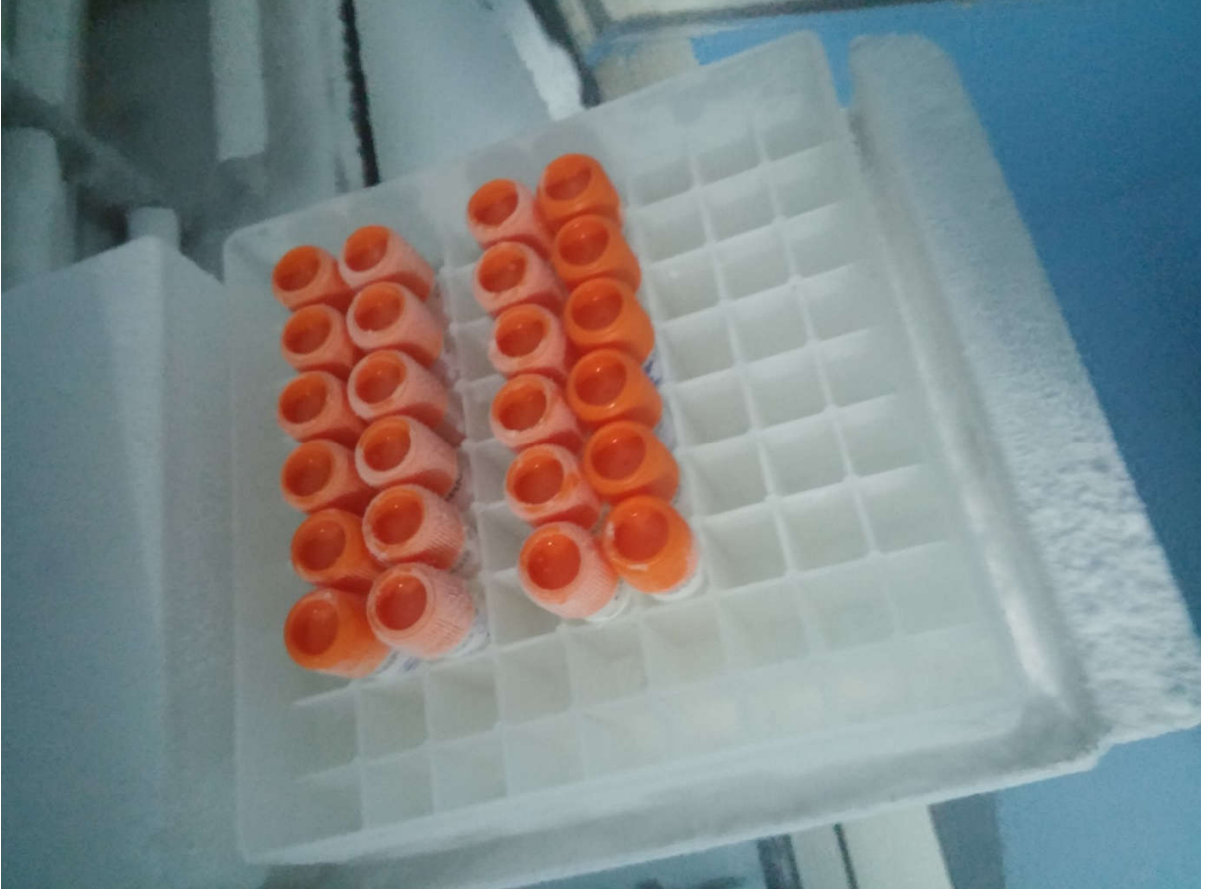
3.4 Değerlendirme kriterleri

Sakrifikasyondan sonra her tavşanın alt üç lomber vertebraları çıkartılarak diskler elde edildi .Daha sonra, kuru buz üzerinde Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ABD. Laboratuvarına nakledildi ve çalışma zamanına dek -80°C 'de saklandı. (Forma -86C ULT Freezer ,Thermo electron Corporation)



Resim 12,13 : Grup B ‘ deki bir tavşanın sakrifikasyon sonrası disklerinin alınması esnasındaki görüntü

Dokular homojenizasyon tamponu içine alınarak Tissue Lyser cihazında homojenize edildi. Doku homojenatlarından elde edilen berrak süpernatant materyalinden daha önce yapılan çalışmalarla disk hasarı sonrası arttığı ve ağrı oluşumunda rol oynadığı gösterilen; Nitrik Oksid (NO), Tissue Inhibitor Matriks Metalloproteinaz 1 (TIMP-1), Matriks Metalloproteinaz 3 ve 13 (MMP-3 ve MMP-13), Interlökin 6 ve IL-1 β ELİSA yöntemi (Rabbit ELISA kitleri) ile analiz edildi.(2-11) Sonuçlar “ birim protein başına analit “ olarak verildi.(20)



Resim 14 : Disklerin numaralandırılarak sırasıyla dizildiği kriyovaller



Resim 15 : Disklerin -80°C 'de saklandığı dolap (Forma -86C ULT Freezer ,Thermo electron Corporation)



Resim 16 : Tissue Lyser cihazı

3.5 Araştırma sonuçlarının değerlendirileceği istatistiksel yöntem:

Elde edilen veriler SPSS 15.0 paket programında değerlendirildi. Veri ortalama, standart sapma, medyan, minimum, maksimum değerleri ile özetlendi. Grupların karşılaştırılmasında Bonferonni düzeltmeli Kruskal Wallis Varyans Analizi kullanıldı. Grupların ikili karşılaştırılmalarında ise Mann Whitney U Testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $p<0.05$ kabul edildi.

4.BULGULAR

Homojenizasyon sonrası doku homojenatından elde edilen materyaldeki total protein konsantrasyonunun 1 mg/ml ‘ nin altında olması nedeniyle B4 ve D6 numaralı denekler analize dahil edilmemiştir.

4.1.Biyokimyasal analiz sonuçları

Tablo 2: ELİSA yöntemi (Rabbit ELISA kitleri) ile yapılan IL-1 β konsantrasyonu analiz sonuçları.

ÖRNEKLER	RAW ABS 1	RAW ABS 2	BLK ABS 1	BLK ABS 2	ORT ABS	KONSANT RASYON (ng/L)	TOTAL PROTEİN KONSANTRASYONU (mg/ml)	1mg/ml protein başına IL-1 β konsantrasyonu (ng/L)
A1	1,152	1,306	1,089	1,243	1,166	17,9	7,09	2,5
A2	0,781	0,968	0,718	0,905	0,8115	10,8	4,50	2,4
A3	0,912		0,849		0,849	11,5	6,52	1,8
A4	0,946	1,015	0,883	0,952	0,9175	12,9	9,61	1,3
A5	0,567	0,69	0,504	0,627	0,5655	5,8	4,43	1,3
A6	1,194	1,266	1,131	1,203	1,167	18,0	8,19	2,2
B1	1,143	1,189	1,08	1,126	1,103	16,7	3,63	4,6
B2	0,992	1,461	0,929	1,398	1,1635	17,9	3,35	5,3
B3	1,162	1,185	1,099	1,122	1,1105	16,8	1,24	13,5
B5	1,212	1,293	1,149	1,23	1,1895	18,4	1,37	13,5
B6	1,201	0,744	1,138	0,681	0,9095	12,8	1,49	8,6
C1	0,925	0,703	0,821	0,599	0,71	8,7	1,32	6,6
C2	1,084	1,124	1,021	1,061	1,041	15,4	5,53	2,8
C3	0,994	1,095	0,89	0,991	0,9405	13,4	4,43	3,0
C4	1,147		1,084		1,084	16,3	5,90	2,8
C5	1,021	1,049	0,958	0,986	0,972	14,0	4,05	3,5
C6	1,122	1,274	1,059	1,211	1,135	17,3	5,31	3,3
D1	1,401	1,122	1,338	1,059	1,1985	18,6	3,02	6,2
D2	1,014	0,826	0,951	0,763	0,857	11,7	2,72	4,3
D3	1,059	1,06	0,996	0,997	0,9965	14,5	6,68	2,2
D4	1,324	1,395	1,261	1,332	1,2965	20,6	4,58	4,5
D5	1,008	1,011	0,945	0,948	0,9465	13,5	5,46	2,5

Tablo 3: ELİSA yöntemi (Rabbit ELISA kitleri) ile yapılan IL 6 konsantrasyonu analiz sonuçları

ÖRNEKLER	RAW ABS 1	RAW ABS 2	BLK ABS 1	BLK ABS 2	ORT ABS	KONSANTRAS YON (ng/L)	TOTAL PROTEİN KONSANTRASYONU (mg/ml)	1mg/ml protein başına IL 6 konsantrasyonu (ng/L)
A1	1,461	1,57	1,401	1,510	1,456	173,6	7,09	24,5
A2	1,028	1,006	0,968	0,946	0,957	87,9	4,50	19,5
A3	1,062		1,002		1,002	93,5	6,52	14,3
A4	0,802	0,856	0,742	0,796	0,769	68,0	9,61	7,1
A5	0,9	0,756	0,840	0,696	0,768	67,9	4,43	15,3
A6	1,349	1,368	1,289	1,308	1,299	140,1	8,19	17,1
B1	1,285	1,257	1,225	1,197	1,211	124,4	3,63	34,2
B2	1,276	1,276	1,216	1,216	1,216	125,2	3,35	37,3
B3	1,214	1,353	1,154	1,293	1,224	126,5	1,24	101,6
B5	1,24	1,366	1,180	1,306	1,243	129,9	1,37	95,0
B6	1,533	1,308	1,473	1,248	1,361	152,5	1,49	102,4
C1	1,179		1,112		1,112	108,6	1,32	82,6
C2	1,199	1,225	1,139	1,165	1,152	114,7	5,53	20,7
C3	1,476	1,615	1,409	1,548	1,479	179,2	4,43	40,5
C4	0,884	1,22	0,824	1,160	0,992	92,2	5,90	15,6
C5	1,207	1,16	1,147	1,100	1,124	110,4	4,05	27,2
C6	1,342	1,325	1,282	1,265	1,274	135,4	5,31	25,5
D1	1,463	1,356	1,403	1,296	1,35	150,2	3,02	49,8
D2	1,085	1,038	1,025	0,978	1,002	93,4	2,72	34,4
D3	1,376	1,257	1,316	1,197	1,257	132,3	6,68	19,8
D4	1,498	1,512	1,438	1,452	1,445	171,2	4,58	37,4
D5	1,165	1,116	1,105	1,056	1,081	104,1	5,46	19,1

Tablo 4: ELİSA yöntemi (Rabbit ELISA kitleri) ile yapılan MMP 3 konsantrasyonu analiz sonuçları

ÖRNEKLER	RAW ABS 1	RAW ABS 2	BLK ABS1	BLK ABS 2	ORT ABS	KONSANT RASYON (ng/ml)	TOTAL PROTEİN KONSANTR ASYONU (mg/ml)	1mg/ml protein başına MMP 3 konsantrasyonu (ng/ml)
A1	1,6	1,548	1,5405	1,4885	1,5145	10,04	7,1	1,42
A2	1,052	1,086	0,9925	1,0265	1,0095	4,95	4,5	1,10
A3	1,144		1,0845		1,0845	5,50	6,5	0,84
A4	1,19	1,126	1,1305	1,0665	1,0985	5,61	9,6	0,58
A5	0,949	0,969	0,8895	0,9095	0,8995	4,25	4,4	0,96
A6	1,218	1,449	1,1585	1,3895	1,274	7,17	8,2	0,88
B1	1,437	1,392	1,3775	1,3325	1,355	8,03	3,6	2,21
B2	1,393	1,329	1,3335	1,2695	1,3015	7,45	3,4	2,22
B3	1,459	1,569	1,3995	1,5095	1,4545	9,23	1,2	7,42
B5	1,458	1,436	1,3985	1,3765	1,3875	8,41	1,4	6,15
B6	1,291		1,2315		1,2315	6,76	1,5	4,53
C1	1,524	1,465	1,4625	1,4035	1,433	8,96	1,32	6,81
C2	1,328	1,325	1,2685	1,2655	1,267	7,10	5,5	1,28
C3	1,47	1,458	1,4085	1,3965	1,4025	8,58	4,43	1,94
C4	1,439	1,456	1,3795	1,3965	1,388	8,41	5,9	1,43
C5	1,414	1,35	1,3545	1,2905	1,3225	7,67	4,1	1,89
C6	1,534	1,509	1,4745	1,4495	1,462	9,33	5,3	1,76
D1	1,517	1,479	1,4575	1,4195	1,4385	9,03	3,0	2,99
D2	1,228	1,262	1,1685	1,2025	1,1855	6,34	2,7	2,33
D3	1,693	1,391	1,6335	1,3315	1,4825	9,60	6,7	1,44
D4	1,627	1,742	1,5675	1,6825	1,625	11,72	4,6	2,56
D5	1,206	1,263	1,1465	1,2035	1,175	6,24	5,5	1,14

Tablo 5: ELİSA yöntemi (Rabbit ELISA kitleri) ile yapılan MMP 13 konsantrasyonu analiz sonuçları

ÖRNEKLER	RAW ABS 1	RAW ABS 2	BLK ABS1	BLK ABS 2	ORT ABS	KONSANTR ASYON (ng/ml)	TOTAL PROTEİN KONSANTR ASYONU (mg/ml)	1mg/ml protein başına MMP 13 konsantrasyonu (ng/ml)
A1	1,118	1,155	1,0635	1,1005	1,082	5,04	7,09	0,71
A2	0,706	0,707	0,6515	0,6525	0,652	3,07	4,50	0,68
A3	0,809	0,815	0,7545	0,7605	0,7575	3,47	6,52	0,53
A4	0,886	0,827	0,8315	0,7725	0,802	3,65	9,61	0,38
A5	0,665	0,628	0,6105	0,5735	0,592	2,87	4,43	0,65
A6	0,961	0,954	0,9065	0,8995	0,903	4,10	8,19	0,50
B1	0,961	0,855	0,9065	0,8005	0,8535	3,88	3,63	1,07
B2	0,903	0,885	0,8485	0,8305	0,8395	3,81	3,35	1,14
B3	1,165		1,1105		1,1105	5,21	1,24	4,19
B5	1,008	1,082	0,9535	1,0275	0,9905	4,54	1,37	3,32
B6	1,097	1,014	1,0425	0,9595	1,001	4,59	1,49	3,08
C1	1,163	1,234	1,106	1,177	1,1415	5,40	1,32	4,11
C2	0,819	0,818	0,7645	0,7635	0,764	3,50	5,53	0,63
C3	0,951		0,894		0,894	4,06	4,43	0,92
C4	0,887	0,807	0,8325	0,7525	0,7925	3,61	5,90	0,61
C5	0,654	0,707	0,5995	0,6525	0,626	2,98	4,05	0,74
C6	1,168	0,975	1,1135	0,9205	1,017	4,68	5,31	0,88
D1	1,112	1,028	1,0575	0,9735	1,0155	4,67	3,02	1,55
D2	0,795	0,801	0,7405	0,7465	0,7435	3,41	2,72	1,26
D3	0,817	0,752	0,7625	0,6975	0,73	3,36	6,68	0,50
D4	0,991	1,02	0,9365	0,9655	0,951	4,34	4,58	0,95
D5	0,805	0,78	0,7505	0,7255	0,738	3,39	5,46	0,62

Tablo 6: ELİSA yöntemi (Rabbit ELISA kitleri) ile yapılan NO konsantrasyonu analiz sonuçları

ÖRNEKLER	RAW ABS 1	RAW ABS 2	BLK ABS1	BLK ABS 2	ORT ABS	KONSANTR ASYON ($\mu\text{mol/L}$)	TOTAL PROTEİN KONSANTR ASYONU (mg/ml)	1mg/ml protein başına NO konsantrasyonu ($\mu\text{mol/L}$)
A1	1,089	1,143	1,0305	1,0845	1,0575	22,75	7,09	3,2
A2	0,658	0,668	0,5995	0,6095	0,6045	13,61	4,50	3,0
A3	0,69	0,691	0,6315	0,6325	0,632	14,04	6,52	2,2
A4	0,791	0,856	0,7325	0,7975	0,765	16,33	9,61	1,7
A5	0,506	0,528	0,4475	0,4695	0,4585	11,53	4,43	2,6
A6	0,878	0,896	0,8195	0,8375	0,8285	17,54	8,19	2,1
B1	1,031	0,92	0,9725	0,8615	0,917	19,40	3,63	5,3
B2	0,933	0,855	0,8745	0,7965	0,8355	17,68	3,35	5,3
B3	1,457		1,3985		1,3985	33,50	1,24	26,9
B5	1,1	0,983	1,0415	0,9245	0,983	20,91	1,37	15,3
B6	0,938	1,047	0,8795	0,9885	0,934	19,78	1,49	13,3
C1	1,131		1,0845		1,0845	23,46	1,32	17,8
C2	0,797	0,731	0,7385	0,6725	0,7055	15,26	5,53	2,8
C3	0,902	0,798	0,8555	0,7515	0,8035	17,05	4,43	3,9
C4	0,795	0,694	0,7365	0,6355	0,686	14,93	5,90	2,5
C5	0,689	0,699	0,6305	0,6405	0,6355	14,09	4,05	3,5
C6	0,794	0,893	0,7355	0,8345	0,785	16,70	5,31	3,1
D1	0,837	0,813	0,7785	0,7545	0,7665	16,35	3,02	5,4
D2	0,635	0,644	0,5765	0,5855	0,581	13,25	2,72	4,9
D3	0,634	0,711	0,5755	0,6525	0,614	13,75	6,68	2,1
D4	0,907	0,874	0,8485	0,8155	0,832	17,61	4,58	3,8
D5	0,661	0,674	0,6025	0,6155	0,609	13,68	5,46	2,5

Tablo 7: ELİSA yöntemi (Rabbit ELISA kitleri) ile yapılan TIMP 1 konsantrasyonu analiz sonuçları

ÖRNEKLER	RAW ABS 1	RAW ABS 2	BLK ABS1	BLK ABS 2	ORT ABS	KONSANTR ASYON (pg/ml)	TOTAL PROTEİN KONSANTR ASYONU (mg/ml)	1mg/ml protein başına TIMP 1 konsantrasyonu (pg/ml)
A1	1,316	1,468	1,264	1,416	1,34	3923,51	7,09	553,0
A2	0,942	0,798	0,89	0,746	0,818	1912,62	4,50	424,7
A3	0,891		0,839		0,839	1968,71	6,52	301,9
A4	0,86	0,785	0,808	0,733	0,7705	1791,57	9,61	186,4
A5	0,548	0,512	0,496	0,46	0,478	1197,79	4,43	270,6
A6	0,885	1,058	0,833	1,006	0,9195	2199,40	8,19	268,7
B1	1,046	0,975	0,994	0,923	0,9585	2320,69	3,63	639,1
B2	1,432	1,191	1,38	1,139	1,2595	3511,98	3,35	1047,2
B3	1,598	1,42	1,546	1,368	1,457	4609,10	1,24	3703,4
B5	1,391	1,033	1,339	0,981	1,16	3062,47	1,37	2239,8
B6	1,123	1,191	1,071	1,139	1,105	2839,19	1,49	1905,5
C1	1,175		1,127		1,127	2926,48	1,32	2225,5
C2	0,941	1,133	0,889	1,081	0,985	2406,91	5,53	435,2
C3	1,037	1,08	0,989	1,032	1,0105	2492,89	4,43	563,4
C4	1,032	0,98	0,98	0,928	0,954	2306,36	5,90	391,0
C5	1,023	0,98	0,971	0,928	0,9495	2292,12	4,05	565,4
C6	1,029	1,211	0,977	1,159	1,068	2698,21	5,31	507,9
D1	1,256	1,133	1,204	1,081	1,1425	2989,59	3,02	990,8
D2	0,693	0,76	0,641	0,708	0,6745	1569,80	2,72	577,7
D3	1,065	0,962	1,013	0,91	0,9615	2330,30	6,68	349,0
D4	1,407	1,409	1,355	1,357	1,356	4010,88	4,58	876,4
D5	0,808	0,84	0,756	0,788	0,772	1795,27	5,46	328,9

4.2 İstatistiksel analiz sonuçları

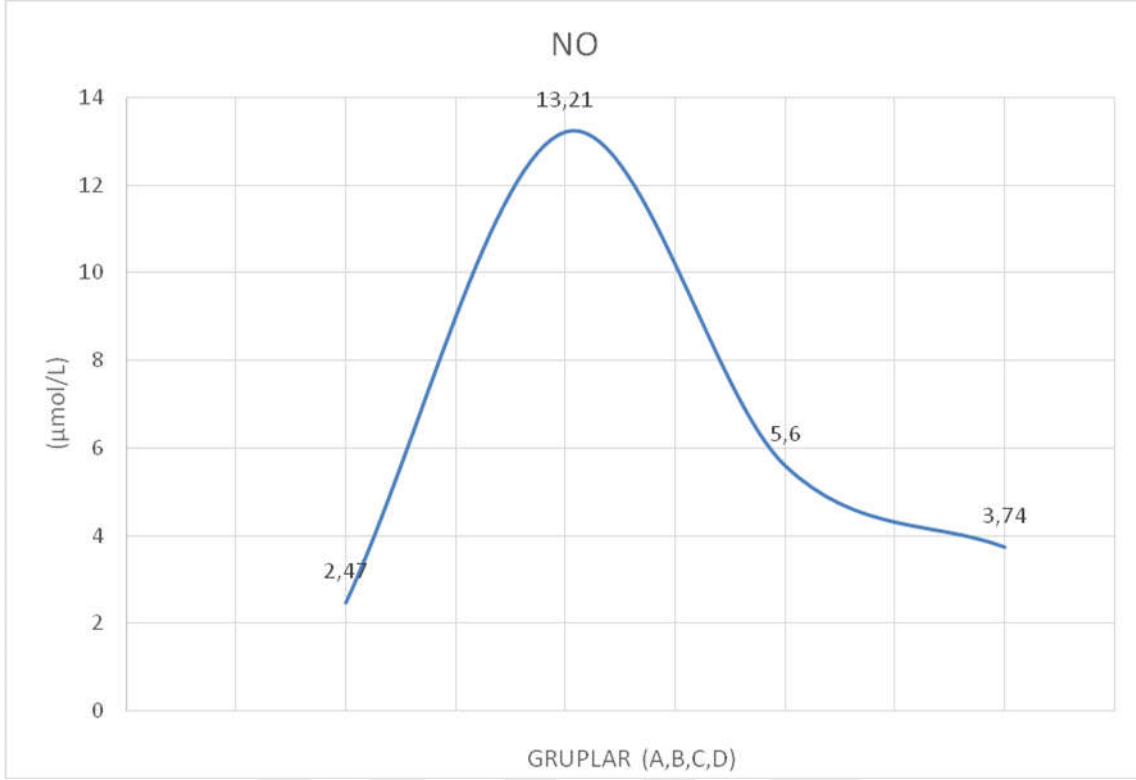
Tablo 8 : Tüm grupların tanımlayıcı istatistiksel analizi

Grup		NO	IL1Beta	mmp3	TiMP1	MMP13	IL6
A	Mean	2,4712	1,9167	,9633	334,2167	,5750	16,3000
	N	6	6	6	6	6	6
	Std. Deviation	,57758	,53448	,28154	132,12648	,12693	5,79241
	Minimum	1,70	1,30	,58	186,40	,38	7,10
	Maximum	3,21	2,50	1,42	553,00	,71	24,50
	Median	2,3787	2,0000	,9200	286,2500	,5900	16,2000
B	Mean	13,2187	9,1000	4,5060	1907,0000	2,5600	74,1000
	N	5	5	5	5	5	5
	Std. Deviation	8,90298	4,29127	2,32874	1192,1238	1,39117	35,14328
	Minimum	5,27	4,60	2,21	639,10	1,07	34,20
	Maximum	26,92	13,50	7,42	3703,40	4,19	102,40
	Median	13,2723	8,6000	4,5300	1905,5000	3,0800	95,0000
C	Mean	5,6004	3,6667	2,5183	781,4000	1,3150	35,3500
	N	6	6	6	6	6	6
	Std. Deviation	6,01451	1,46379	2,11852	710,86900	1,37507	24,60575
	Minimum	2,53	2,80	1,28	391,00	,61	15,60
	Maximum	17,84	6,60	6,81	2225,50	4,11	82,60
	Median	3,3102	3,1500	1,8250	535,6500	,8100	26,3500
D	Mean	3,7422	3,9400	2,0920	624,5600	,9760	32,1000
	N	5	5	5	5	5	5
	Std. Deviation	1,45508	1,63187	,77677	301,28854	,43707	12,91278
	Minimum	2,06	2,20	1,14	328,90	,50	19,10
	Maximum	5,42	6,20	2,99	990,80	1,55	49,80
	Median	3,8491	4,3000	2,3300	577,7000	,9500	34,4000
Total	Mean	6,0561	4,4864	2,4491	879,6136	1,3191	38,2227
	N	22	22	22	22	22	22
	Std. Deviation	6,43540	3,43668	1,97615	875,79068	1,18824	29,56721
	Minimum	1,70	1,30	,58	186,40	,38	7,10
	Maximum	26,92	13,50	7,42	3703,40	4,19	102,40
	Median	3,3419	3,1500	1,8250	558,2000	,8100	26,3500

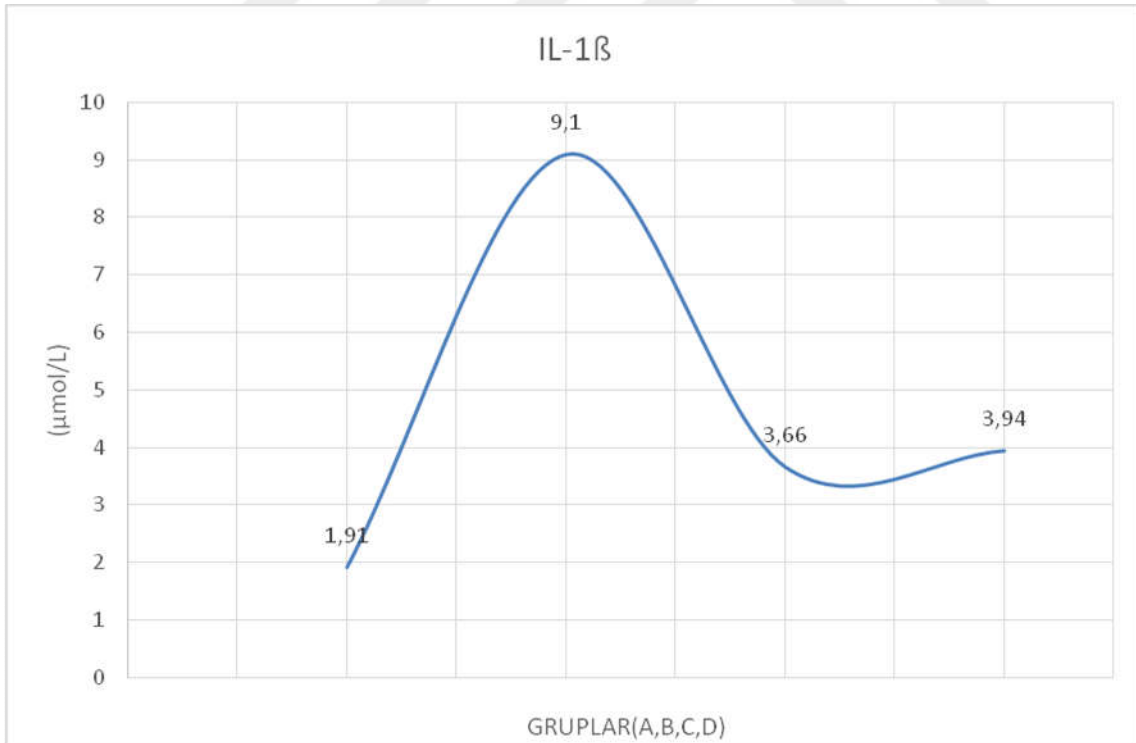
Tablo 9: Kruskal-Wallis test analizi

	NO	IL1Beta	mmp3	TiMP1	MMP13	IL6
Chi-Square	11,000	15,187	13,865	13,011	10,356	12,099
df	3	3	3	3	3	3
p	,012	,002	,003	,005	,016	,007

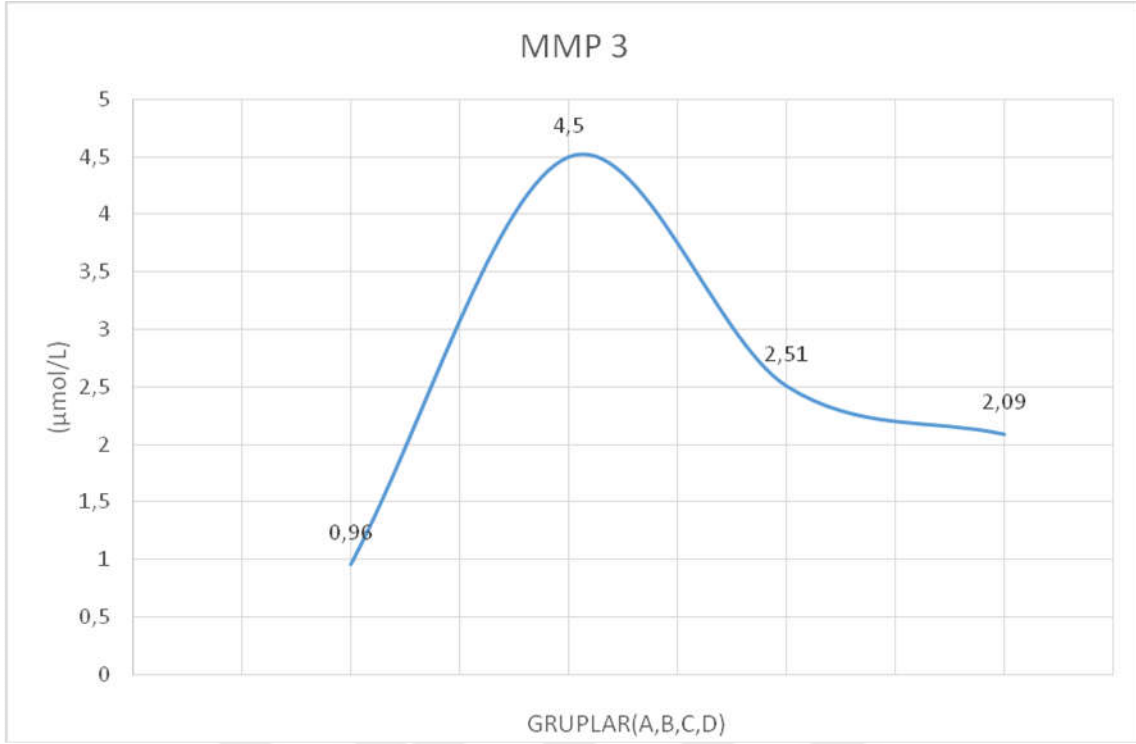
Kruskal-Wallis test analizine göre tüm proinflatuar mediatörler için gruplar arasında anlamlı fark saptandı.($p < 0,05$)



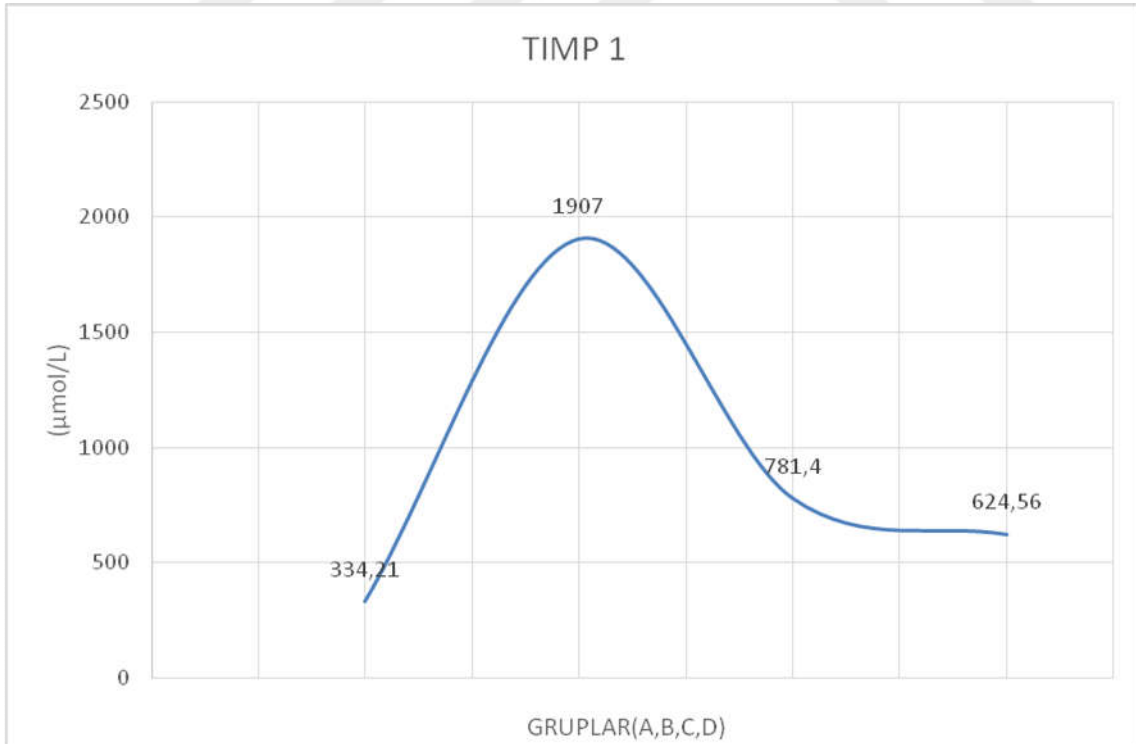
Grafik 1 : Sırasıyla A,B,C ve D gruplarında NO mean değerlerini gösteren grafik



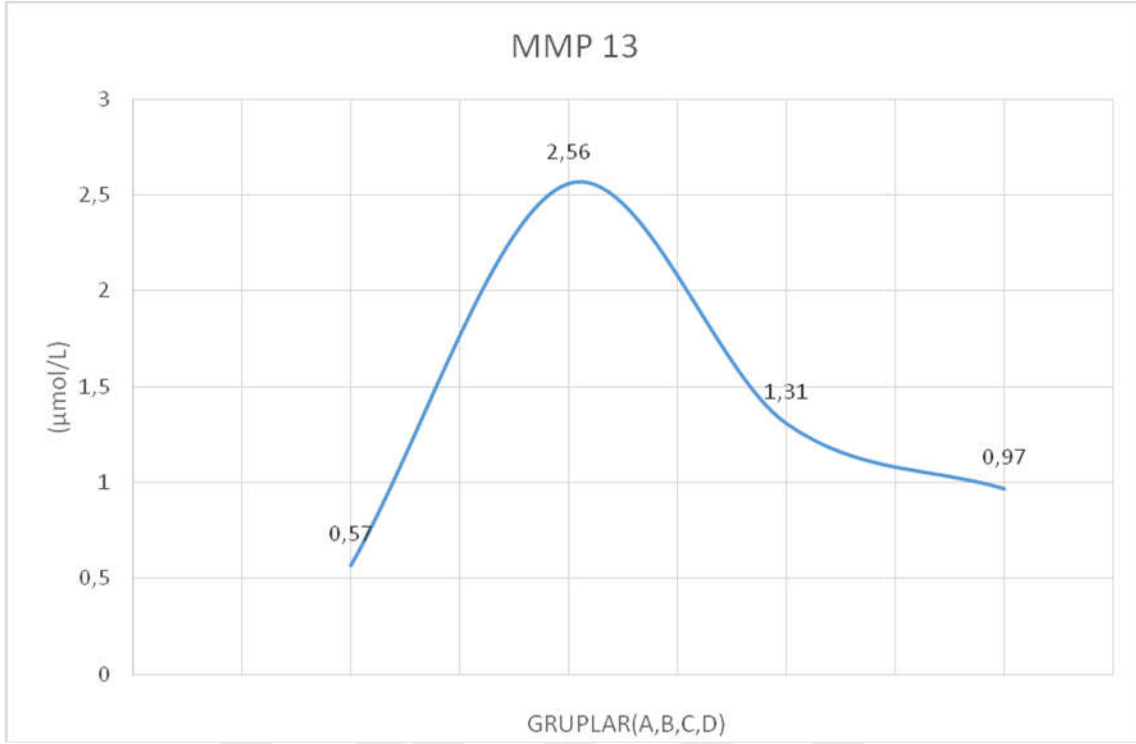
Grafik 2 : Sırasıyla A,B,C ve D gruplarında IL-1β mean değerlerini gösteren grafik



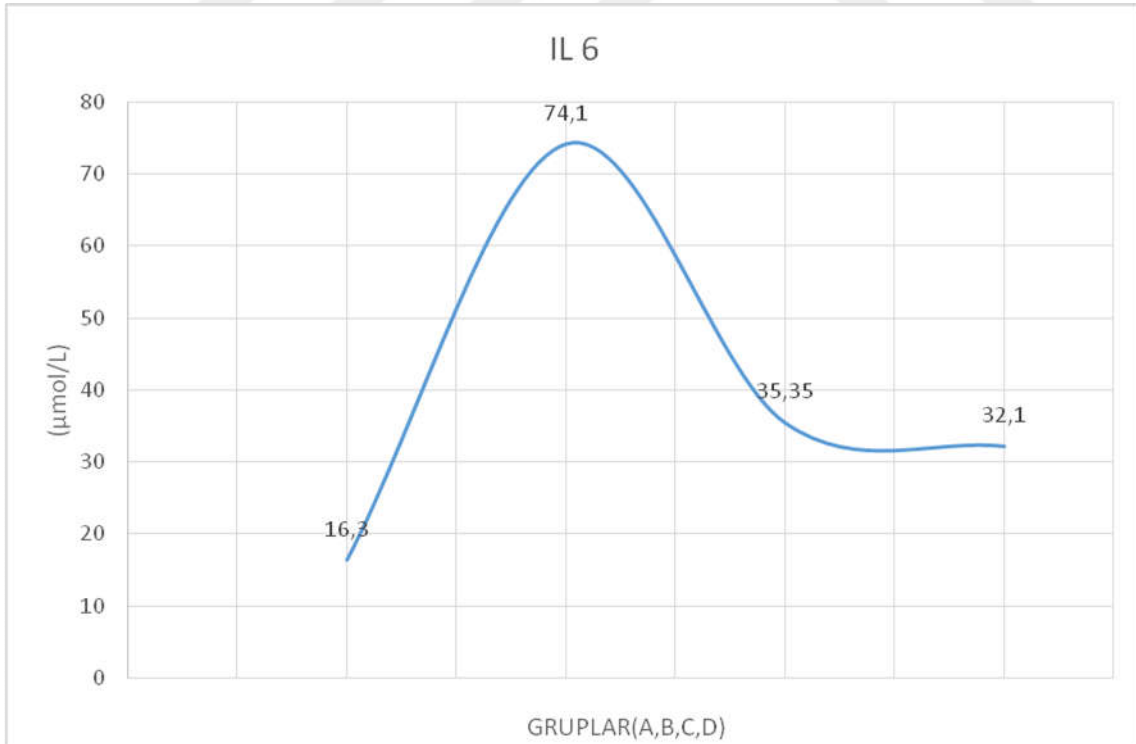
Grafik 3 : Sırasıyla A,B,C ve D gruplarında MMP 3 mean değerlerini gösteren grafik



Grafik 4 : Sırasıyla A,B,C ve D gruplarında TIMP 1 mean değerlerini gösteren grafik



Grafik 5 : Sırasıyla A,B,C ve D gruplarında MMP 13 mean değerlerini gösteren grafik



Grafik 6 : Sırasıyla A,B,C ve D gruplarında IL 6 mean değerlerini gösteren grafik

Tablo 10: A ve B gruplarının Mann-Whitney U testi kullanılarak yapılan ikili karşılaştırma analizi

	NO	IL-1 β	MMP 3	TiMP 1	MMP 13	IL6
Mann-Whitney U	,000	,000	,000	,000	,000	,000
Wilcoxon W	21,000	21,000	21,000	21,000	21,000	21,000
Z	-2,739	-2,751	-2,739	-2,739	-2,739	-2,739
Asymp. Sig. (2-tailed)	,006	,006	,006	,006	,006	,006
P	,004 ^a	,004 ^a	,004 ^a	,004 ^a	,004 ^a	,004 ^a

a. Not corrected for ties.

A ve B gruplarının yapılan ikili karşılaştırma analizine göre ; tüm proinflatuar mediatör değerleri B grubunda A grubuna göre anlamlı ölçüde yüksek saptandı.(p = 0,04)

Tablo 11: A ve C gruplarının Mann-Whitney U testi kullanılarak yapılan ikili karşılaştırma analizi

	NO	IL-1 β	MMP 3	TiMP 1	MMP 13	IL6
Mann-Whitney U	6,000	,000	1,000	4,000	6,000	4,000
Wilcoxon W	27,000	21,000	22,000	25,000	27,000	25,000
Z	-1,922	-2,892	-2,722	-2,242	-1,922	-2,242
Asymp. Sig. (2-tailed)	,055	,004	,006	,025	,055	,025
P	,065 ^a	,002 ^a	,004 ^a	,026 ^a	,065 ^a	,026 ^a

a. Not corrected for ties.

A ve C gruplarının yapılan ikili karşılaştırma analizine göre; IL-1 β ,MMP 3 ,TIMP 1 ve IL 6 değerleri C grubunda A grubuna göre anlamlı ölçüde yüksek saptandı. (p = 0,002, p = 0,004, p = 0,026, p = 0,026)

Tablo 12 : A ve D gruplarının Mann-Whitney U testi kullanılarak yapılan ikili karşılaştırma analizi

	NO	IL-1 β	MMP 3	TİMP 1	MMP 13	IL6
Mann-Whitney U	8,000	3,000	1,000	4,000	7,500	3,000
Wilcoxon W	29,000	24,000	22,000	25,000	28,500	24,000
Z	-1,278	-2,206	-2,556	-2,008	-1,372	-2,191
Asymp. Sig. (2-tailed)	,201	,027	,011	,045	,170	,028
P	,247 ^a	,030 ^a	,009 ^a	,052 ^a	,177 ^a	,030 ^a

a. Not corrected for ties.

A ve D gruplarının yapılan ikili karşılaştırma analizine göre; IL-1 β ,MMP 3 ve IL 6 değerleri D grubunda A grubuna göre anlamlı ölçüde yüksek saptandı.(p=0,03, p=0,009, p=0,03)

Tablo 13 : B ve C gruplarının Mann-Whitney U testi kullanılarak yapılan ikili karşılaştırma analizi

	NO	IL-1 β	MMP 3	TİMP 1	MMP 13	IL6
Mann-Whitney U	4,000	2,000	4,000	3,000	4,000	4,000
Wilcoxon W	25,000	23,000	25,000	24,000	25,000	25,000
Z	-2,008	-2,384	-2,008	-2,191	-2,008	-2,008
Asymp. Sig. (2-tailed)	,045	,017	,045	,028	,045	,045
P	,052 ^a	,017 ^a	,052 ^a	,030 ^a	,052 ^a	,052 ^a

a. Not corrected for ties.

B ve C gruplarının yapılan ikili karşılaştırma analizine göre; IL-1 β ve TİMP 1 değerleri C grubunda B grubuna göre anlamlı ölçüde düşük saptandı.(p=0,017, p=0,03)

Tablo 14 : B ve D gruplarının Mann-Whitney U testi kullanılarak yapılan ikili karşılaştırma analizi

	NO	IL-1 β	MMP 3	TIMP 1	MMP 13	IL6
Mann-Whitney U	2,000	2,000	6,000	2,000	4,000	5,000
Wilcoxon W	17,000	17,000	21,000	17,000	19,000	20,000
Z	-2,193	-2,200	-1,358	-2,193	-1,776	-1,567
Asymp. Sig. (2-tailed)	,028	,028	,175	,028	,076	,117
P	,032 ^a	,032 ^a	,222 ^a	,032 ^a	,095 ^a	,151 ^a

a. Not corrected for ties.

B ve D gruplarının yapılan ikili karşılaştırma analizine göre; NO, IL-1 β ve TIMP 1 değerleri D grubunda B grubuna göre anlamlı ölçüde düşük saptandı. (p=0,032 ,p=0,032 , p=0,032)

Tablo 15 : C ve D gruplarının Mann-Whitney U testi kullanılarak yapılan ikili karşılaştırma analizi

	NO	IL-1 β	MMP 3	TIMP 1	MMP 13	IL6
Mann-Whitney U	14,000	15,000	13,000	15,000	14,000	15,000
Wilcoxon W	29,000	30,000	34,000	30,000	35,000	30,000
Z	-,183	,000	-,365	,000	-,183	,000
Asymp. Sig. (2-tailed)	,855	1,000	,715	1,000	,855	1,000
P	,931 ^a	1,000 ^a	,792 ^a	1,000 ^a	,931 ^a	1,000 ^a

a. Not corrected for ties.

C ve D gruplarının yapılan ikili karşılaştırma analizine göre ; tüm proinflatuar mediatör değerleri açısından C ve D grupları arasında anlamlı fark saptanmadı.(p>0,05)

Tablo 16 : B grubunun (füzyon (–)), C ve D gruplarının toplamıyla (füzyon(+)) Mann-Whitney U testi kullanılarak yapılan ikili karşılaştırma analizi

	NO	IL-1 β	MMP 3	TiMP 1	MMP 13	IL6
Mann-Whitney U	6,000	4,000	10,000	5,000	8,000	9,000
Wilcoxon W	72,000	70,000	76,000	71,000	74,000	75,000
Z	-2,436	-2,666	-1,983	-2,549	-2,209	-2,096
Asymp. Sig. (2-tailed)	,015	,008	,047	,011	,027	,036
P	,013 ^a	,005 ^a	,052 ^a	,009 ^a	,027 ^a	,038 ^a

a Not corrected for ties.

B grubunun (füzyon (–)), C ve D gruplarının toplamıyla (füzyon(+)) yapılan ikili karşılaştırma analizine göre; NO, IL-1 β , TiMP 1 ,MMP 13 ve IL 6 değerleri C+D grubunda B grubuna göre anlamlı ölçüde düşük saptandı. (p=0,013, p=0,005 p=0,009, p=0,027, p=0,038)

5.TARTIŞMA

Bel ağrısı, insanoğlunu tarihin başından beri tehdit eden, soğuk algınlığından sonra ikinci sıklıkta tıbbi yardım almayı gerektirecek düzeyde sosyoekonomiyi ekileyen yaygın bir sağlık sorunudur. (68,69,70) Bel ağrısının en sık nedenlerinden birisi intervertebral disk dejenerasyonu olup , diğer nedenler ise metabolik, neoplastik, konjenital, enfeksiyöz, muskuloskeletal, vasküler ve başarısız bel cerrahisi sendromu olarak bildirilmektedir. (71)

İVDD'da ağrı oluşum mekanizmasını açıklamaya yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır. Ancak bu konu henüz tam netliğe kavuşmamıştır. Kepler ve ark.na göre İVDD'da patolojik innervasyon ve IL-1 β ,MMP' lar gibi proinflamatuvar mediatorlerin artışı sebebiyle ağrı oluşur. (10) Purmessur ve ark. sığır İVD kültüründe , dejenerasyon sonrasında IL-1 β , MMP 3 ve MMP 13 ün önemli ölçüde yükseldiğini belirtmiştir(7). Goupille ve ark . İVDD'da TNF α 'nın arttığını bu artışın MMP 3 ' ün sentezini arttırdığını böylece ekstraselüler matriksin degrade olduğunu göstermiştir (72).Myagi ve ark. ise Sprague Dawley türü ratlarda oluşturduğu İVDD modelinde İVD dinamik kompresyonu ile hasarı sonrasında IL-1 β 'nın akut dönemde önemli ölçüde arttığını göstermiştir(6).(p < 0,05)

Mevcut literatürü incelediğimizde , ağrıya yol açan disklerde proinflamatuvar mediatör düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. Burke ve ark. diskojenik ağrı sebebiyle diskektomi ameliyatı yapılan hastalardan elde edilen 63 ve füzyon ameliyatı geçiren hastalardan 20 disk örneğinde yaptıkları inceleme sonucunda ağrıya yol açan disklerde proinflamatuvar mediatorlerden IL 6 ve IL 8 (p < 0.006 ve p < 0.003) miktarlarının artmış olduğunu göstermiştir(2). Kang ve ark. ise lomber disk herniasyonu olup diskektomi operasyonu geçiren 15 hastadan toplam 18 lomber disk örneği incelemiş ve kontrol grubuna göre önemli ölçüde artmış IL 6 (p< 0.035) ve NO (p < 0,000036) seviyeleri saptamıştır. (4) Kepler ve ark. diskojenik ağrı sebebiyle diskektomi ameliyatı olan hastalardan elde edilen 7 diski , ağrıya yol açan herhangi bir disk ya da spinal patolojisi olmadığı bilinen otopsilerden elde edilen 9 disk örneğiyle karşılaştırmış. Sonuç olarak ağrıya yol açan disklerde IL-1 β düzeyi anlamlı olarak yüksek bulunmuştur(5).(p < 0,03)

Kwon ve arkadaşları resveratrolun dejenere olmuş tavşan disklerindeki anabolik/antikatabolik etkilerini araştırmıştır. 4,5 aylık ve 3-3.5 kg olan 24 Yeni Zelanda albino suşu tavşan üzerinde, tıpkı bizim hayvan modelimizde olduğu gibi 18 Gauge iğne ile floroskopi yardımıyla L2-L3 L4-L5 Disklerine delici yaralanma yapılmıştır. Bir gruba

resveratrol bir gruba dimetil sülfoksit (dmso) yapılmış. 2 hafta ara verilip bir doz daha resveratrol ve dmso yapılmış. L3-L4 diski ise kontrol (sham) grubu yapılmış.4 haftanın sonunda çekilen T2 ağırlıklı MR' larda resveratrol grubunda dmso grubuna göre daha güçlü sinyaller tespit edilmiştir. 8. ve 16. haftalarda da güçlü sinyal tespit edilmiştir. Bu çalışma; genel anestezi indüksiyonu, periosta ve yumuşak dokulara en az zararla disk hasarı oluşturmak için 18 Gauge iğne ile ap/lat floroskopi görüntüleri eşliğinde dejenerasyon yaratılması yönüyle çalışmamızla benzerlik göstermektedir. (15).

Bizim bu çalışmada geliştirdiğimiz disk dejenerasyonu ve füzyon modeline göre öncelikle tavşanların alt üç lomber diski lateral oblik prone pozisyonda, skopi eşliğinde 18 gauge iğne ucu ile delici yaralanma yaparak disklerde dejenerasyon oluşturduk. Grup C ve D'ye aynı zamanda alt üç lomber vertebraya , lamina ve spinöz proses dekontikasyonu ve iliak kanattan alınan otogreftle posterior ve posterolateral spinal füzyon oluşturduk. Ayrıca D grubunu füzyon sonrası uzun dönem sonuçları değerlendirmek için ' C ' grubundan 4 hafta sonra sakrifiye ettik.

Disk dejenerasyonu sonrasında tüm proinflatuar mediatörlerde anlamlı artışlar tespit edildi. NO, IL-1 β , IL 6 , TİMP 1, MMP 3 ve MMP 13 düzeyleri, sadece disk dejenerasyonu yapılan B grubunda kontrol grubu olan A grubuna göre önemli ölçüde yüksek saptandı . (p=0,004) IL-1 β , IL 6 ve MMP 3 düzeyleri , A-C ve A-D grupları arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda da C ve D gruplarında kontrol grubu olan A grubuna göre anlamlı ölçüde yüksek saptandı.(p<0,05)

Boden tavşanlar üzerinde uygulanan posterolateral spinal füzyon modelini ilk olarak ortaya atmıştır. Boden'in tavşanlarda tanımladığı bu modele göre posterolateral spinal füzyon, posterior mid-line insizyonla ve tek seviye olarak transvers proseslerin bilateral paraspinal eksplorasyonu ile yapılır.9 aylık (4.5-5 kg) olan tavşanlarda L4-L5 veya L5-L6'yı tercih etmiştir. İliak kanattan 2-2.5 cm³ kadar alınan grefti kullanmıştır .Füzyonun başarısını anlamak için palpasyonun geçerli ve güvenilir bir yöntem olduğunu belirtmiştir (12). Bizde sakrifikasyon aşamasında D grubunda füzyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini inspeksiyonla ve palpasyonla test ettik. D grubundaki tüm deneklerde inspeksiyonda füzyon geliştiğini tespit ettik. D2 , D3 ve D5 numaralı deneklerde palpasyonla da başarılı bir posterior füzyon gerçekleştiğini palpe ettik. Boden in başarı oranı da % 67'de kalmıştır.

Araştırmamıza başlarken tüm unsurları göz önüne alıp optimal bir füzyon oluşturmayı amaçladık. Bu nedenle çalışmanın başında Riordan ve ark. nın yaptığı meta analizden de yararlandık. Riordan ve ark.1995 den 2011 yılına kadar olan 56 çalışmayı içeren , toplam 733 tavşanda posterolateral spinal füzyon modeli ile ilgili yaptıkları meta analizde spinal füzyon başarısına etki edebilecek cerrahi teknik,yaş,cinsiyet,ağırlık,iliak kanattan alınan greft büyüklüğü gibi faktörleri irdelemiş. Çalışmaya göre başarılı füzyon için en az 5 hafta süre geçmeli, hayvanın yaşı >6 ay ve ağırlığı >3 kg olmalı, iliak kanattan alınan kemik grefti >1 cm³ ,seviye ise L4-L5 veya L5-L6 olmalıdır. 2 cm³ ün üstünde iliak kanat kemik greftinin tıpkı insanlarda olduğu gibi morbiditeyi arttırdığından 1 cm³ ile 2 cm³ arası bir değerde olmalıdır. Bu bilgiler; bizim çalışmamızda olduğu gibi , bundan sonra yapılacak olan diğer çalışmalarda da posterolateral füzyonu optimize etmek için kullanılabilir. Bu çalışmaya göre de cerrahi sırasında yapılan manuel palpasyon psödoartrozu göstermek için kullanılan altın standart bir klinik bulgudur. (13)

Jonathan ve ark.füzyon başarısını ölçmek için palpasyon ve fleksibilite testini kullanmıştır.10 adet Yeni Zelanda albino cinsi tavşanı üzerinde yapılan çalışmada iliak kanattan alınan kemik grefti kullanılmış , L5-L6 intertransvers füzyon yapılmış ve 5. haftanın sonunda tavşanlar sakrifiye edilmiştir.2 tavşan anestezi komplikasyonu ve yara yeri enfeksiyonu nedeniyle çalışmadan çıkarılmıştır. Biyomekanik testlerde 5. haftanın sonunda önemli ölçüde fleksiyon kısıtlılığı %81 ekstansiyon kısıtlılığı % 61, Right-Left lateral bending kısıtlılığı %67 ve % 83 (p < 0,01)saptanmıştır.8 hayvanın 5 inde farklı iki araştırmacı tarafından yapılan manuel palpasyonda katı füzyon olduğu görülmüştür. Bu çalışma 5 hafta sonunda füzyonun büyük ölçüde gerçekleştiğini gösteriyor. (17)

Valdes ve ark . tavşanlarda tanımlanan posterolateral spinal füzyon modelinin cerrahi tekniğini incelemiştir.77 Yeni Zelanda albino cinsi tavşanın ilk 48 inde (Grup A) ortaya çıkan komplikasyonlar değerlendirilerek bir deney protokolü oluşturulmuştur. Sonraki 29 hayvan (Grup B) komplikasyon yaşanmadan bitirilmiştir. En sık komplikasyonlar sinir paralizi, anestezi komplikasyonlar , yanlış seviye füzyonu ve enfeksiyon olarak belirlenmiş(16). Bizim çalışmamızda da 4 tavşan anestezi komplikasyonlar ve kanama sebebiyle kaybedildi fakat yeniden etik kurul onayı alınıp ekstra 4 tavşan alınarak çalışma sürdürüldü.

Yaptığımız literatür incelemelerine göre posterior vertebral füzyonun İVDD ' da artan proinflatuar mediatörler üzerine etkisini gösteren bir çalışma yoktur. Bu çalışmada geliştirdiğimiz hayvan modelinde elde ettiğimiz grafıklara tekrar bakacak olursak

proinflatuar mediatör düzeyleri disk dejenerasyonundan sonra önemli ölçüde artmakta, füzyon sonrasında ise bu değerler giderek azalmakta ve beş haftanın sonunda kontrol grubunda ki değerlere kadar yaklaşmaktadır.

Füzyon yapılmasa da bu değerler zamanla azalabilir düşüncesi de doğru olabilir ama biz füzyon yapılmadan grafiklerde görülen dramatik azalmanın olmayacağı konusunda daha uzun bir süre ağrıya sebep olacağı kanaatindeyiz. Bununla birlikte gelecekte yapılacak olan çalışmalarda bu modele ek olarak disk dejenerasyonunun uzun dönem etkisini araştırmak için dejenerasyon sonrası bir süre beklendikten sonra sakrifikasyon yapılabilir.

Bu çalışmaya göre posterior vertebral füzyon sonrasında tüm proinflatuar mediatör düzeylerinde azalma tespit edildi. B grubunun (füzyon (-)), C ve D gruplarının toplamıyla (füzyon(+)) yapılan ikili karşılaştırma analizine göre; NO, IL-1 β , TIMP 1 ,MMP 13ve IL 6 değerleri C+D grubunda B grubuna göre anlamlı ölçüde düşük saptandı . (p<0,05) B ve D gruplarının yapılan ikili karşılaştırmasına göre ise ; NO , IL-1 β ve TIMP 1 değerleri D grubunda B grubuna göre anlamlı ölçüde düşük saptandı. (p=0,032 ,p=0,032 , p=0,032)

İVDD ‘ da cerrahi dışında farklı birçok biyolojik tedavi yöntemleri araştırılmıştır. Rekombinan proteinler, gen tedavileri, büyüme faktörleri , kök hücre tedavisi birçok çalışmanın konusu olmuştur. Thompson ve ark. İVDD’da TGF β ile tedavi yöntemini araştırmış fakat büyüme faktörlerinin yarılanma ömürlerinin çok kısa, hastalığınsa uzun yıllar süren kronik bir süreç olduğu düşünülürse daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğunu , uzun süre etkilerinin net olmadığını belirtmiştir .(73) Wallach ve ark. İVDD’da MMP’lar ve katabolik süreçlerin aktive olduğundan yola çıkarak anti-katabolik gen tedavisini denemiştir. Antikatabolik faktör olarak TIMP 1’i kullanmıştır. Adenovirüsler aracılığıyla TIMP 1 uygulanan disklerde proteoglikan sentezinin arttığını ve gelecekte AD-TIMP 1 kompleksinin İVDD tedavisinde kullanılabileceğini belirtmiştir. (9)

Howard ve ark. biyolojik tedavi yöntemlerinden Osteojenik Protein (OP 1) ve Kondroitinaz ABC’nin ; çeşitli in vivo ve in vitro çalışmalarda ekstraselüler matriks ve prostoglandin sentezinin artmasında , dejenere diskin rejenere olmasında etkili olduğunu göstermiştir. Bu ajanların tek başına veya birlikte gelecekte insanlarda İVDD tedavisinde de kullanılabileceği umulmaktadır(1).

6.SONUÇ

Bu çalışmada geliştirdiğimiz tavşan omurgasında disk dejenerasyon modeliyle; disk dejenerasyonunun proinflatuar mediatörleri arttırdığını saptadık. Füzyon yapılan ve beklenen grupta ise bu mediatörlerin azaldığını tespit ettik. Bu sonuçlar, posterior vertebral füzyonun bel ağrısının giderilmesindeki rolünü açıklayabilir. Bu çalışmadaki disk dejenerasyonu ve füzyon modeli gelecekte disk dejenerasyonu kaynaklı bel ağrısını önlemeye yönelik çalışmalarda kullanılabilir.

İVDD ‘da deneysel biyolojik tedavi yöntemleri de araştırılmıştır. Rekombinan proteinler, büyüme faktörleri, kök hücre ve gen tedavileri denenmiştir. Fakat rekombinan proteinler ve büyüme faktörlerinin yarılanma ömürlerinin çok kısa, hastalığınsa uzun yıllar süren kronik bir süreç olduğu düşünülürse etkinlikleri tartışmalıdır. Kök hücre ve gen tedavileri içinse daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

7.KAYNAKLAR

- 1.An HS,Thonar EJMA ,Masuda K.Biological repair of intervertebral disc.Spine 2003;28:S86-92
- 2.Burke JG, Watson RWG,McCormack D, Dowling FE, Walsh MG, Fitzpatrick JM. Intervertebral discs which cause low back pain secrete high levels of proinflammatory mediators. J Bone Joint Surgery (Br) 2002;84:196-602
- 3.Hsiesh AH ,Lotz JC.Prolonged spinal loading induces matrix metalloproteinase -2 activation in intervertebral discs.Spine 2003;28:1781-88
- 4.Kang JD, Georgescu HI, McIntyre-Larkin L, Stefanovic-Racic M, Donaldson WF III, Evans CH. Herniated lumbar intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin-6, and prostaglandin E2. Spine 1996; 21: 271–7.
5. Kepler CK1, Markova DZ, Dibra F, Yadla S, Vaccaro AR, Risbud MV, Albert TJ, Anderson DG. Expression and Relationship of Proinflammatory Chemokine RANTES/CCL5 and Cytokine IL-1 β in Painful Human Intervertebral Discs, Spine 2013;38:873–880
6. Miyagi M1, Ishikawa T, Kamoda H, Suzuki M, Murakami K, Shibayama M, Orita S, Eguchi Y, Arai G, Sakuma Y, Kubota G, Oikawa Y, Ozawa T, Aoki Y, Toyone T,Takahashi K, Inoue G, Kawakami M, Ohtori S.
ISSLS prize winner: disc dynamic compression in rats produces long lasting increases in inflammatory mediators in discs and induces long-lasting nerve injury and regeneration of the afferent fibers innervating discs: a pathomechanism for chronic discogenic low back pain. Spine 2012 ; 37:1810–1818
7. Purmessur D1, Walter BA, Roughley PJ, Laudier DM, Hecht AC, Iatridis J.
A role for TNF α in intervertebral disc degeneration: a nonrecoverable catabolic shift. Biochem Biophys Res Commun 2013 ;433(1):151–156.

8. Schroeder M1, Viezens L, Schaefer C, Friedrichs B, Algenstaedt P, R  ther W, Wiesner L, Hansen-Algenstaedt N. Chemokine profile of disc degeneration with acute or chronic pain. *J Neurosurg Spine* 2013 ;18:496–503
9. Wallach CJ, Sobajima S, Watanabe Y, Kim JS, Georgescu HI, Robbins P, Gilbertson LG, Kang JD . Gene transference of the catabolic inhibitor TIMP-1 increases measures proteoglycans in cells from degenerated human intervertebral discs. *Spine* 2003;28:2331-7
10. Kepler CK1, Anderson DG, Tannoury C, Ponnappan RK Intervertebral disk degeneration and emerging biologic treatments. *J Am Acad Orthop Surg.* 2011; 19:543-53.
11. Wallach CJ, Gilbertson LG, Kang JD. Gene therapy applications for intervertebral disc degeneration. *Spine* 2003;28:93-8
12. Boden SD, Schimandle JH, Hutton WC. 1995. An experimental lumbar intertransverse process spinal fusion model. Radiographic, histologic, and biomechanical healing characteristics. *Spine* 20:412–420.
13. Riordan AM, Rangarajan R, Balts JW, Hsu WK, Anderson PA. Reliability of the rabbit postero-lateral spinal fusion model: A meta-analysis. *J Orthop Res.* 2013;31(8):1261-9
14. Palumbo M, Valdes M, Robertson A, Sheikh S, Lucas P. Posterolateral intertransverse lumbar arthrodesis in the New Zealand White rabbit model: I. Surgical anatomy. *Spine J.* 2004 May-Jun;4(3):287-92.
15. Kwon YJ. Resveratrol has anabolic effects on disc degeneration in a rabbit model. *J Korean Med Sci.* 2013 Jun;28(6):939-45.
16. Valdes M, Palumbo M, Appel AJ, McAllister S, Ehrlich M. Posterolateral intertransverse lumbar arthrodesis in the New Zealand White rabbit model: II. Operative technique. *Spine J.* 2004 May-Jun;4(3):293-9.

17. Erulkar JS, Grauer JN, Patel TC, Panjabi MM. Flexibility analysis of posterolateral fusions in a New Zealand white rabbit model. Spine (Phila Pa 1976). 2001 May 15;26(10):1125-30.
18. Ghodasra JH1, Daley EL, Hsu EL, Hsu WK. Factors influencing arthrodesis rates in a rabbit posterolateral spine model with iliac crest autograft. Eur Spine J. 2014 Feb;23(2):426-34.
19. Kant AP, Daum WJ, Dean SM, et al. Evaluation of lumbar spine fusion: plain radiographs versus direct surgical exploration and observation. Spine 1996; 20:2313–7.
20. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. Anal Biochem 1994; 218:325–9
- 21 . Kayalı H. İnsan embriyolojisine giriş.s :49-67 .Taş matbaası – İstanbul 1982
22. Alıcı E . Omurganın morfolojisi .s:1-34 Omurga Hastalıkları ve Deformiteleri ,Dokuz Eylül Üniversitesi Yayınları,İzmir, 1991
23. Simeone R. Rothman R.H. The Spine ,Third edition,W.B. Saunders Company ,1992.
24. Alıcı E. Omurganın Biyomekaniği s:35-72 Omurga Hastalıkları ve Deformiteleri ,Dokuz Eylül Üniversitesi Yayınları,İzmir, 1991
25. Gray H. , Pickering T. Havdan R .Gray's Anatomy:270-286 ,New York ,1997
26. Panjabi M.M.Clinical biomechanics of the spine s:1-124 Second edition , 1990
27. Hall J.S.,Basic Biomechanics.s :276-287 Fourth edition ,2001,
28. Benzel C.E.,Omurga stabilizasyonunun biyomekaniği,prensip ve klinik uygulama.s : 45-59 Tunç Matbaacılık,İstanbul ,1998.

29. Modic MT. ,Masaryk T., Ross j.,Carter J. Imaging of degenerative disk disease.Radiology 1988 ;168:177-186
30. Urban JPG.,Holm S., Maroudas A.,Nachemson A.Nutrition of the intervertebral disc.Clin Orthop and Related Research 1977;129:101-114
31. Eyring E. The Biochemistry and physiology of the intervertebral disc. Clin Orthop and Related Research 1969;67:16-28
32. Kumar S. Biomechanics in Ergonomics.s:243-269,2001
33. Baldertson R.,Albert T., McIntosh T.,Wong L.Magnetic Resonance imaging analysis of lumbar disc changes below scoliosis fusions.Spine 1998 ;23(1):54-59
34. Adams MA.,Dolan P.,Hutton WC.,Porter RW.Diurnal changes in spinal mechanics and their clinical significance .J Bone and Joint Surg.1990;72-B:266-270
35. Coppes MH.,Marani E., Thomeer RM.,Groen G.Innervation of ‘painful’ lumbar discs.Spine 1997 :22(20) ;2342-2350
36. Luoma K. Rihimaki H.,Lukkonen R.,Raininko R.Low back pain in relation to lumbar disc degeneration.Spine 2000;25(4):1029-1034
37. Olmarker K., Blomquist J.,Stromberg J.,Nannmark U.,Thomsen P.Inflamatogenic properties of nucleus pulposus.Spine 1995 ;20(6):665-669
38. Barrie M .,Videman T.,Gill K.,Moneta G.,Nyman R.1991 Volvo award in clinical sciences.Smoking and lumbar intervertebral disc degeneration :an MRI study of identical twins.Spine 1991;16(9):1015-1021
39. Weinstein N.J.,Stephen L.G.Low back pain.First Edition,s:607-625,1996.
40. Crean JK.,Roberts S.,Jaffray D.,Eisenstein S.Matrix Metalloproteinases in the human intervertebral disc :role in disc degeneration and scoliosis.Spine 1997;22(24):2877-2884

41. Miller JAA, Schmatz C, Schultz AB. Lumbar disc degeneration: correlation with age, sex and spine level in 600 autopsy specimens. *Spine* 1988;13(2):173-178
42. Oppenheim JJ, Ruscetti FW, Faltynek C. Cytokines. In : Stites DP, Terr AI, ed. *Basic and Clinical Immunology* 1994:105-123.
43. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cytokines. *Cellular and Molecular Immunology* Philadelphia : WB Saunders Company. 1994 : 240-261.
44. Dinarello CA. Interleukin-1 in infectious diseases *Immunological Reviews* 1992,127:119-146
45. Fanslow WC, Sims JE, Sassenfeld H. Regulation of alloreactivity in vivo by soluble form of the interleukin -1 receptor: *Science* 1990, 248: 739-742.
46. Dinarello CA. Interleukin -1 and the pathogenesis of the acute phase response : *N Engl J Med* 1984, 311: 1413-1418.
47. Dinarello CA. IL -1 and IL -1 antagonism: *Blood* 1991, 77 :1627.
48. Kishimoto T. The biology of interleukin - 6 : *Blood* 1989, 74 :1-10.
49. Horii Y, Muraguchi A, Iwano M. Involvement of IL -1 in mesangial proliferative glomerulonephritis : *J Immunol* 1989,143 : 3949-3955.
50. Stahl RAK. Chemoattractive cytokines (Chemokines) and immune renal injury: *Nephrol Dial Transplant* 1995 ,10: 307-319.
51. Kuralay F, Çavdar Z. İnflamatuvar medyatörlere toplu bir bakış, *Genel Tıp Dergisi* 2006;16(3):143-152
52. Snoek-van Beurden PAM, Von den Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques* 2005;38:73-83.

53. Kerkelä E, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp Dermatol* 2003;12:109-125.
54. Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG, Dayer JM. IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest* 1995;96:2304-2310.
55. Osman M, Tortorella M, Londei M, Quarantino S. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases define the migratory characteristics of human monocyte-derived dendritic cells. *Immunology* 2002;105:73-82.
56. Guedez L, Courtemanch L, Stetler-Stevenson M. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 induces differentiation and an antiapoptotic phenotype in germinal center B cells. *Blood* 1998;92:1342-1349.
57. Li G, Fridman R, Kim HR. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 inhibits apoptosis of human breast 253 epithelial cells. *Cancer Res* 1999;59:6267-6275.
58. Valente P, Fassina G, Melchiori A, Masiello L, Cilli M, Vacca A, et al. TIMP-2 overexpression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *Int J Cancer* 1998;75:246-253.
59. Schwartz SB, Aleman TS, Cideciyan AV, Swaroop A, Jacobson SG, Stone EM. De novo mutation in the RP1 gene (Arg677Ter) associated with retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:3593-3597.
60. Verstappen J, Von den Hoff JW. Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs): Their Biological Functions and Involvement in Oral Disease. *J Dent Res* 2006;85:1074-1084.
61. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med*. 2005;9:267-85.
62. Maskos K. Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors. *Biochimie*. 2005;87:249-63.
63. Nishizuka I, Ichikawa Y, Ishikawa T, Kamiyama M, Hasegawa S, Momiyama N et al. Matrilysin stimulates DNA synthesis of cultured vascular endothelial cells and induces angiogenesis in vivo. *Cancer Lett*. 2001;173:175-82.

64. Folgueras AR, Pendás AM, Sánchez LM, López-Otín C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol* 2004;48:411-24.
65. Zhou Z, Apte SS, Soininen R, Cao R, Baaklini GY, Rauser RW et al. Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I. *Proc Natl Acad Sci U S A*.2000;97:4052-7.
66. Pilcher BK, Dumin JA, Sudbeck BD, Krane SM, Welgus HG, Parks WC. The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *J Cell Biol*.1997;137:1445-57.
67. Wiseman BS, Sternlicht MD, Lund LR, Alexander CM, Mott J, Bissell MJ et al. Site-specific inductive and inhibitory activities of MMP-2 and MMP-3 orchestrate mammary gland branching morphogenesis. *J Cell Biol*.2003;162:1123-33.
68. Tulder M, Malmivaara A, Esmail R., Koes B: Exercise Therapy for Low Back Pain. *Spine*, 2000, 25 (21): 2784-2796
69. Berker E: Bel Ağrısında Epidemiyoloji In: Özcan E (ed), Ketenci A, Bel Ağrısı Tanı ve Tedavi, Nobel Kitabevi, İstanbul, 51-56
70. Kopec J, Sayre E, Esdaile J: Predictors of Back Pain in a General Population Cohort. *Spine*, 2003, 29 (1): 70-78
71. Sinaki M, Mokri B. Low back pain and disorders of the lumbar spine. *Physical medicine and rehabilitation ed. Braddom R WB Saunders Company* 1996; 813-850.
72. Goupille P, Jayson MI, Valat JP, Freemont AJ.: Matrix metalloproteinases: the clue to intervertebral disc degeneration ? *Spine (Phila Pa 1976)* 23(14):1612-1626, 1998
73. Thompson JP, Oegema TR Jr, Bradford DS: Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth factors. *Spine (Phila Pa 1976)* 16:253–260, 1991