

İnsan amniyon sıvısının pektus cerrahisinde kullanılan sternotominin iyileşmesi üzerindeki etkileri: Deneysel çalışma

Effects of human amniotic fluid on the healing of sternotomy used in pectus surgery: experimental study

Sedat Gürkök,¹ Kuthan Kavaklı,¹ Hasan Çaylak,¹ Orhan Yücel,¹ Ersin Sapmaz,¹
Sezai Çubuk,¹ Mehmet Gamsızkan,² Onur Genç¹

Gülhane Askeri Tıp Akademisi ¹Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı, ²Patoloji Anabilim Dalı, Ankara

Amaç: Bu çalışmada insan amniyon sıvısının sternotomi hattının iyileşmesi üzerindeki etkileri araştırıldı.

Çalışma planı: Çalışmada 200-300 gr ağırlığında 30 adet Wistar albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar kontrol grubu ve çalışma grubu olmak üzere iki gruba ayrıldı. Osteotomi her sıçanda aynı bölgeye uygulandı. Sıçanların her birinden biyokimyasal parametreler için kan örnekleri alındı ve kemik grafileri çekildi. Çalışma grubunda osteotomi hattına insan amniyon sıvısı uygulandı. Sıçanlar 1, 2. ve 4. haftalarda sakrifiye edildi. Doku örnekleri histopatolojik olarak incelendi.

Bulgular: Histopatolojik incelemede gruplar arasında anlamlı fark tespit edilemedi, fakat bazı biyokimyasal parametreler açısından mevcut olan farklar istatistiksel olarak anlamlı idi. Röntgen sonuçları arasında da anlamlı fark bulunamadı.

Sonuç: İnsan amniyon sıvısı temini ve uygulanabilirliğinin kolay olması nedeni ile kırık iyileşmesinde kullanılacak alternatif ajanlar arasında değerlendirilebilir.

Anahtar sözcükler: Amniyon sıvısı; iyileşme; sternotomi.

Pektus cerrahisinde amaç, deforme olan göğüs ön duvarının yeniden şekillendirilmesi ve hastanın erken dönemde günlük hayatına kavuşturulmasıdır. Bu konuda son zamanlarda, pektus cerrahisinde yeni yöntemler geliştirilmekte ve uygulanan klasik yöntemler modifiye edilerek daha etkili yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır.^[1] Bu çalışmadaki amacımız, pektus deformite cerrahisinde sternuma uygulanan osteotomi hattının erken dönemde iyileşmesinde insan amniyon sıvısı (İAS)'nın etkinliğini araştırmaktır.

Background: In this article we studied the effects of human amniotic fluid on the healing of sternotomy line.

Methods: Thirty male Wistar albino rats weighing 200-300 gr were used in this study. The rats were divided into two groups as the control group and the study group. Osteotomy was performed on same region in each rat. Blood samples were obtained from each rat for biochemical studies and bone X-rays were taken. Human amniotic fluid was applied on the osteotomy line in the study group. The rats were sacrificed at 1st, 2nd, and 4th weeks. Tissue samples were examined histopathologically.

Results: No statistically significant differences were found between the groups in the histopathologic examinations, although the differences in some biochemical parameters were statistically significant. There were also no significant differences between the X-ray results.

Conclusion: The human amniotic fluid can be considered as an alternative agent, which is easy to provide and apply also can be used to improve fracture healing.

Key words: Amniotic fluid; healing; sternotomy.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu deneysel çalışma, GATA Etik Kurulu'ndan onay alındıktan sonra Wistar albino cinsi ortalama ağırlıkları 200-300 g olan 30 adet erkek sıçan kullanılarak GATA Araştırma Merkezi Deneysel Cerrahi Araştırma Bölümü'nde yapıldı. Denekler her bir grupta 15 adet denek olacak şekilde rasgele iki gruba ayrıldı.

Deney grupları

Denek olarak sıçan seçilmesinin nedeni sıçanların, laboratuvar ortamında kolayca üretilen ve denek

sayısı yönünden sıkıntı çekilmeyen hayvan olmaları, anatomik olarak sternum ve kotlarının mikrocerrahiye gereksinim olmadan ortaya konulabilmesi ve cerrahi işlemin kolay olmasıdır. Deneklerde alerjen olup olmadığının anlamak için çalışma öncesi beş adet denegin cilt altına 0.1 cc İAS enjekte edildi. Hiçbir denekte erken dönemde ve 24 saat sonraki kontrolde alerjik reaksiyon gözlenmedi.

Tüm deneklerin sternumları üzerinde 4. kot hizasında transvers osteotomi oluşturulduktan sonra birinci grupta yer alan deneklere hiçbir işlem uygulanmadı. Bu grup İAS'nin kemik iyileşmesi üzerine etkisinin değerlendirilerek karşılaştırmanın yapılacağı kontrol grubu olarak kabul edildi. İkinci grupta yer alan deneklerin osteotomi hattına 0.2 cc İAS verildi ve bu grup deney grubu olarak kabul edildi. Her iki gruptan dörder denek 1. haftanın sonunda, dörder denek 2. haftanın sonunda ve yedişer denek de 4. haftanın sonunda sakrifiye edildi.

Cerrahi yöntem

Tüm denekler aynı deneysel şartlara tabi tutuldu ve ameliyattan dört saat önce aç bırakıldı. İndüksiyon anestezi 90 mg/kg ketamin (Ketalar®, Eczacıbaşı®, İstanbul, Türkiye) ve 10 mg/kg ksilazin intraperitoneal uygulanarak sağlandı. Deneklere supin pozisyon verilerek göğüs ön duvarları tıraş edildi ve %10'luk povidon iyot solüsyonu ile boyandı (Batticon; Adeka, Samsun, Turkey). Midsternal cilt insizyonunu takiben cilt altı geçilerek pektoral kaslara ulaşıldı ve bu kas tabakası iki taraflı olarak dekole edilerek sternum ortaya kondu. Sternuma, 4. kotların eklem yaptığı seviyeden makas yardımıyla transvers osteotomi uygulandı. Osteotomi hattı denek gruplarına uygun olarak belirtilen şekilde işlem den geçirildikten sonra pektoral kaslar 3/0 poliglaktin sütür ile yaklaştırıldı ve cilt 2/0 poliprolen sütür ile kapatıldı.

Histopatolojik inceleme

Sernum üzerinde oluşturulan osteotomi hattının iyileşmesini değerlendirmek amacıyla tüm denekler 1, 2. ve 4. haftanın sonunda servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Tüm deneklerin sternumu, osteotomi hattı içinde olacak şekilde çıkarılarak %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonuna konuldu. Kırık hattını içeren örneklenmiş kısımlar dekalsifikasyon işlemi için tamponlu formik asite alındı. Rutin takip işlemlerinden sonra parafine gömülen dokulardan elde edilen 4 µm'lik kesitler hematoksilin eosin boyası ile boyandı. Deneklere ne uygulandığını bilmeyen tek bir patolog tarafından ışık mikroskopu altında yapılan incelemede osteotomi hattındaki iyileşmenin değerlendirilmesi sayısal histolojik skorlama sistemi kullanılarak yapıldı.

Biyokimyasal inceleme

Çalışmaya alınan deneklerden ameliyat öncesinde grup bağımsız olacak şekilde rasgele 10 denekten intrakardiyak kanül girişimi ile kan örnekleri alınarak parathormon (PTH), Mg, P, Ca ve hidroksiprolin (HP) değerleri incelendi ve normal değerler elde edildi. Sakrifikasyon sonrası tüm deneklerden intrakardiyak kanül girişimi ile kan örnekleri alındı. Kontrol grubu ve denek grubundan alınan kan örnekleri santrifüj edildi ve elde edilen serum örnekleri -80 °C'de saklandı. Deney ve kontrol grubuna ait serum örneklerinin biyokimyasal analizi ile elde edilen PTH, Mg, P, Ca ve hidroksiprolin değerleri normal olarak kabul edilen değerler ile karşılaştırıldı.

Radyolojik inceleme

Tüm deneklere ameliyat sonrası, sternum görünecek şekilde X-ray grafi çekildi. Osteotomi hattında sternum üst ve alt periost çizgileri ve kalsifikasyon oluşumu yönünden radyolojik değerlendirmeden geçirildi.

İnsan amniyon sıvısının toplanması

İnsan amniyon sıvısı, Fakülte bünyesinde bulunan Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği'nde prenatal tanı amaçlı olarak gebeliğin 16-20. haftalarında uygulanan amniyosentezlerden 2 cc olacak şekilde ve steril koşullarda toplandı. İşlem öncesi tüm hastalar sözel olarak bilgilendirildi ve razı olduklarına dair onam belgesi alındı. İnsan amniyon sıvısı kullanılmadan önce -80 °C'de saklandı ve kullanılacağı zaman oda havasında kendiliğinden çözünmesi sağlandı. Sıvının toplanması ile topikal olarak kullanılması arasında geçen sürenin bir haftadan fazla olmamasına özen gösterildi.

İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizlerde Windows için SPSS (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) 16.0 versiyon paket program kullanıldı. Deney ve kontrol gruplarındaki kırık hattı iyileşmesinin belirlenmesinde kullanılan histopatolojik değerlendirme skorlama değerleri arasında anlamlılık olup olmadığını ortaya koymak için Pearson ki-kare testi, biyokimyasal verilerin karşılaştırılmasında ise Mann-Whitney U-testi kullanıldı. İstatistiksel olarak p<0.05 olduğunda aradaki fark anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Kontrol grubu ile çalışma grubunun karşılaştırılması sonucu 1, 2. ve 4. hafta sonundaki p değerleri (p=0.572, p=0.172 ve p=0.380) idi. Bulunan hiçbir p değeri 0.05 değerinden küçük olmadığı için istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Histopatolojik değerlendirme skorlama çizelgesi ve haftalara göre skorlama sonuçları tablo 1 ve 2'de verilmiştir.

Tablo 1. Kırık hattı iyileşmesinde kullanılan histolojik sayısal skorlama değerlendirme sistemi

Skor	Kırık hattındaki histopatolojik bulgu
1	Tamamen fibröz doku var
2	Fibröz doku baskın ancak az miktarda kıkırdak var
3	Fibröz doku ve kıkırdak eşit miktarda var
4	Kıkırdak oluşumu baskın ancak az miktarda fibröz doku var
5	Tamamen kıkırdak var
6	Ağırlıklı kıkırdak ve az miktarda immatür kemik dokusu
7	Eşit miktarda kıkırdak ve immatür kemik dokusu
8	Ağırlıklı immatür kemik ve az miktarda kıkırdak doku
9	İmmatür kemik ile kırık iyileşmesi
10	Matür kemik ile kırık iyileşmesi

Birinci hafta sonunda gruplar arası biyokimyasal parametreler referans değerler göze alınarak istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, PTH ve Ca değerleri arasındaki fark her iki grup için de istatistiksel olarak anlamlı bulundu (sırasıyla; $p=0.002$, $p=0.002$, $p=0.002$, $p=0.024$). Parathormon değerlerindeki anlamlılık düşüklük olarak, Ca değerlerindeki anlamlılık ise yükselme olarak gözlemlendi (Tablo 4).

İkinci hafta sonundaki biyokimyasal değerler karşılaştırıldığında kontrol grubunda PTH ve HP değerlerinde istatistiksel anlamlılık bulundu ($p=0.024-0.008$). Parathormon değerlerinde düşüklük, HP değerlerinde yükseklik olarak tespit edildi (Tablo 5).

İkinci hafta sonunda PTH ve HP dışındaki biyokimyasal değerler ile 4. hafta sonundaki biyokimyasal değerler karşılaştırıldığında aradaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Tablo 6).

Tüm gruplarda haftalara göre biyokimyasal parametrelerin karşılaştırılmaları sonucu elde edilen p değerleri tablo 7'de belirtilmiştir.

Deneklere çekilen röntgenler değerlendirildiğinde ameliyat sonrası erken dönem, 1, 2. ve 4. haftalar ara-

sında görünüm olarak sternum üst ve alt periost çizgileri ve kalsifikasyon oluşumu arasında farklılıklar tespit edilemedi (Şekil 1).

TARTIŞMA

Kırık iyileşmesi, temelde bir bağ dokusu iyileşmesi şeklindedir. Yumuşak dokudan farklılığı, osteoblast ve osteoklastların aktiviteleri ile özelleşmiş kalsifiye kemik dokusu oluşumudur.^[2]

Kırık iyileşmesi üç evreye ayrılır: Bu evreler birbiri ile ilişkilidir ve geçici olarak birbiri ile iç içe girebilir.^[3,4] Kırık oluşumu ile birlikte o bölgede inflamasyon başlar ve yaklaşık olarak 2-3 hafta devam eder.^[2-5] Kemik rejenerasyonunda, PTH, kalsitonin, vitamin D metabolitleri ve alkalın fosfataz gibi birçok faktör rol oynar ve bunların kan plazmalarındaki seviyeleri artar. Kırık hattında hematoma oluşur. Hematomla birlikte kırık bölgesine gelen fibroblastlar da kollajen salgılayarak, kırık uçlarını kollajen liflerle birbirine bağlar.^[2,3,6]

Kırık iyileşmesinin iki ya da üçüncü gününde kırık bölgesinde periost ve endosttan köken alan osteoblast ve kondroblastlarda hızlı bir çoğalma görülür.^[2-4,7,8] Kırık iyileşmesinin ikinci aşaması yenilenme fazıdır. Osteogenezis devam eder ve kırık bölgesinde köprü kallus oluşumu sürer.^[3,9]

Oluşan kallus serttir ancak hala dayanıksızdır. Böylece kırık uçları arasındaki stabilite artar. Stabilitenin artması ile fibrokartilajenöz kallusun oluşumunda primer rol oynayan kan damarları medullada yeniden şekillenmeye başlar. Aynı zamanda periost ve endost kökenli osteoblastlar kemik matriksi olan osteoidin yapımına başlar. Ön kallusun yerini yavaş yavaş kemiksi kallus alır. Bu aşamaya 4-6 haftada ulaşılır. Artık kemik kaynaması oluşmuştur.^[2-6,10]

Kırık, kallus ile köprülendiği zaman yeniden şekillenme aşaması başlar. Oluşan büyük kırık kallusu normal kemik iliği boyutuna ulaşmaya kadar osteoklastlar tarafından yıkılır. Bunun sonucunda, havers sistemi

Tablo 2. Haftalara göre histopatolojik sayısal skorlama değerleri

1. Hafta				2. Hafta				4. Hafta			
Grup 1		Grup 2		Grup 1		Grup 2		Grup 1		Grup 2	
Denek	HSSD	Denek	HSSD	Denek	HSSD	Denek	HSSD	Denek	HSSD	Denek	HSSD
1	4	1	3	1	4	1	2+PMNL	1	7	1	8
2	3	2	2+PMNL	2	6	2	6	2	7	2	6
3	1	3	3	3	8	3	6	3	7	3	6
4	3	4	1+PMNL+Apse	4	4+PMNL	4	6	4	6	4	7
							5	5	5	6	6
							6	6	6	9	9
							7	5	7	9	9

PMNL: Polymorphonuclear leukocyte; HSSD: Histopatolojik sayısal skorlama değeri.

Tablo 3. Ameliyat öncesi grup, bağımsız biyokimyasal parametre örnekleri (referans değerler)

Denek no	Grup bağımsız				
	PTH (pg/ml)	Mg (mg/dl)	P (mg/dl)	Ca (mg/dl)	HP (micromol/l)
1	6.08	2.04	4.96	10.68	0.149496
2	6.16	2.52	6.80	10.84	0.191703
3	7.49	2.24	4.60	9.64	0.424567
4	7.08	2.12	6.44	9.80	0.279027
5	5.96	2.08	5.36	10.64	0.385998
6	7.32	1.72	5.12	8.52	0.261562
7	7.24	2.40	6	10.84	0.296491
8	5.80	2.36	6.72	10.88	0.262289
9	7	2.52	7.48	10.32	0.089825
10	8.60	1.84	5.88	9.64	0.209895

PTH: Pratiroid hormon; Mg: Magnezyum; P: Fosfat; Ca: Kalsiyum; HP: Hidroksiprolin.

bulunan lameller kemik yapısı oluşur. Bu süreç yıllar boyunca devam edebilir.^[3-5,7,8,10]

Göğüs ön duvarı stabilizasyonu temel olarak iki faktöre bağlıdır. Birincisi; deforme olan ve çıkarılan kostal kartilajların rejenerasyonu, ikincisi; rezeke edilen sternumun psödoartroz olmadan kaynamasıdır. Kostal kartilaj rejenerasyonu en erken olarak 21 günde başlar, sternumun kaynaması üç aylık zaman gerektirir. Bundan dolayı göğüs duvarı stabilizasyonu için gereken süre en az üç aydır. Uzun bir süre olması ve hareket kısıtlılığı gerektirmesinden dolayı, hastalar tarafından tolere edilemeyebilir ve sonuçta rekürens gelişmesine neden olabilir. Bir başka sorun da deforme olan ve rezeke edilen kıkırdak kot yataklarında fibröz doku gelişmesi ve toraks duvar esnekliğinin bozulmasıdır. Göğüs duvarı hareketli ve esnek bir yapıdır, bu esnek yapının bozulması akciğer ekspansiyonuna engel durum teşkil edebilir. Bu nedenden dolayı birçok araştırmacı kostal kartilajların tamamen değil, parsiyel rezeke edilmesini ve kıkırdak büyüme hattı olan kostokondral bileşkede kıkırdak yapısının korunması gerektiğini vurgulamışlardır.^[6]

Günümüzde pektus cerrahisi için birçok teknik kullanılmaktadır. Birçok teknikte, deforme kıkırdaklar çıkarılır ve sternuma uygun yerlerine wedge veya osteotomi şeklinde rezeksiyon uygulanır.^[1] Sternum stabilizasyo-

nunda teknikler arasında farklılıklar vardır. Burada esas olan sternumun stabilizasyonunun çok iyi yapılmasıdır.

Çalışmamızda insanlardan alınan İAS kullanıldı. Tavşana ait amniyon sıvısı yerine insan amniyon sıvısı kullanmamızın nedenleri; İAS içerisinde büyüme faktörleri, ekstraselüler matriks proteinlerine ait prekürsörler, hyalüronik asit (HA) ve hyalüronik asit-stimülan aktivatörün (HASA) varlığı ve miktarının daha önceki çalışmalar ile gösterilmiş olması,^[11] prenatal tanı işlemleri arasında yer alan amniyosentez işleminin kadın hastalıkları ve doğum kliniği'nde yaygın olarak yapılan bir işlem olmasından dolayı İAS elde etmenin kolay olması, buna benzer tavşan kullanılarak yapılan deneysel çalışma modellerinde İAS'ye karşı herhangi bir hücrel immün yanıtın gelişmediğinin gösterilmiş olması^[11-14] ve tavşan amniyosentezinin zor elde edilmesi ve alınan miktarın yeterli olamamasıdır.

İnsan amniyon sıvısı sterilidir. İkinci trimesterde İAS'de IgG seviyesi en üst düzeydedir, bundan dolayı virüs, bakteri, mikoplazma, mantar veya klamidya gibi mikroorganizmalar üreyecek ortam bulamazlar.^[11-14]

Yapılan çalışmalar neticesinde, birçok büyüme faktörünün ve ekstraselüler matriks proteinlerinin osteositlerin büyüme ve farklılaşması üzerine olumlu etkisi olduğu bulunmuştur. İnsan amniyon sıvısı özellikle ikinci trimesterde bu proteinleri yoğun olarak içermektedir. Ekstraselüler matriks bileşenleri kemik veya yumuşak doku zedelenmesinin iyileşmesinde önemli rol oynar. Özellikle kondroitin sülfat osteoindüktif aktivite göstermeksinin osteojenik etki gösterir. İnsan amniyon sıvısı içerdiği bileşenlerden dolayı kemik iyileşmesini subperi-kondriyal uygulama sonrası artırıcı etki gösterir ve içinde yoğun şekilde HA, HASA ve diğer ekstraselüler matriks bileşenlerini bulundurur.^[13,14] Yapılan birçok deneysel çalışmada İAS'nin özellikle kıkırdak ve kemik rejenerasyonunda pozitif etkili olduğu vurgulanmıştır.^[15-17]

Bizim çalışmamızda histopatolojik değerlendirme skorlaması sonucu elde edilen değerlerde istatistiksel olarak hiçbir grupta anlamlı sonuç bulunamadı. Ancak gruplarda elde edilen histopatolojik değerler incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da

Tablo 4. Biyokimyasal veri sonuçları birinci hafta

Denek no	Grup 1					Denek no	Grup 2				
	PTH (pg/ml)	Mg (mg/dl)	P (mg/dl)	Ca (mg/dl)	HP (micromol/l)		PTH (pg/ml)	Mg (mg/dl)	P (mg/dl)	Ca (mg/dl)	HP (micromol/l)
1	1.2	2.42	6.74	11.16	0.234637	1	1.37	2.16	5.05	10.64	0.244097
2	1.2	2.44	5.95	11.39	0.116022	2	1.20	3.95	8.95	11.79	0.259379
3	1.2	2.35	5.71	10.91	0.335787	3	1.20	2.39	6.65	11.25	0.196796
4	1.2	2.33	5.62	11.73	0.110200	4	1.39	2.24	5.92	11.2	0.284120

PTH: Pratiroid hormon; Mg: Magnezyum; P: Fosfat; Ca: Kalsiyum; HP: Hidroksiprolin.

Tablo 5. Biyokimyasal veri sonuçları ikinci hafta

Denek no	Grup 1					Denek no	Grup 2				
	PTH (pg/ml)	Mg (mg/dl)	P (mg/dl)	Ca (mg/dl)	HP (micromol/l)		PTH (pg/ml)	Mg (mg/dl)	P (mg/dl)	Ca (mg/dl)	HP (micromol/l)
1	1.20	2.27	5.14	10.77	0.314684	1	5.78	2.28	5.56	10.48	0.240458
2	1.20	2.22	6.27	10.76	0.642149	2	5	2.52	6.44	10.4	0.145130
3	1.20	2.01	3.93	11.22	0.508252	3	7.42	2.40	5.40	11	0.126937
4	6.85	2.24	4.44	9.92	0.810248	4	5.9	2.52	5	11.12	0.111656

PTH: Pratiroid hormon; Mg: Magnezyum; P: Fosfat; Ca: Kalsiyum; HP: Hidroksiprolin.

Tablo 6. Biyokimyasal veri sonuçları dördüncü hafta

Denek no	Grup 1					Denek no	Grup 2				
	PTH (pg/ml)	Mg (mg/dl)	P (mg/dl)	Ca (mg/dl)	HP (micromol/l)		PTH (pg/ml)	Mg (mg/dl)	P (mg/dl)	Ca (mg/dl)	HP (micromol/l)
1	6.72	2.04	5.32	10.80	0.158228	1	7.55	2.72	5.08	10.76	0.516984
2	8.34	2.28	8.08	10.08	0.222266	2	4.98	1.92	5.32	10.44	0.172782
3	5.55	1.84	4.84	10.76	0.233909	3	8.63	2.12	4.48	10.24	0.141491
4	5.80	4.44	11.60	12.64	0.263017	4	5.83	3.80	9.44	12.68	0.158956
5	7.06	2.36	5.68	11.40	0.321233	5	6.59	2.44	5.36	10.96	0.146585
6	7.37	2.24	4.92	10.76	0.607947	6	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	-

PTH: Pratiroid hormon; Mg: Magnezyum; P: Fosfat; Ca: Kalsiyum; HP: Hidroksiprolin.

değer bazında kemik iyileşmesi üzerine pozitif etkili olduğu söylenebilir.

Kemik iyileşmesi için günümüzde greftler veya değişik materyaller kullanılmaktadır. Bu maddelerin kemik iyileşmesi üzerine etkileri osteogenezis, osteoindüksiyon veya osteokonstrüksiyon şeklinde olur.

Parçalı veya defektli kemik kırıklarında günümüzde birçok greft materyali kullanılmaktadır. Kullanılan bu greftlerin avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Avantajları ve dezavantajları değerlendirildiğinde, greft materyallerinin kullanım oranları azalmıştır. Ototreftlerin yerine kullanılabilir çok sayıda allojenik ve ksenojenik kemik greft materyalinin değişik yöntemler kullanılarak hazırlanmasıyla da, şiddetli immünolojik yanıt gösteren ksenogreftler dışında, doğal greft materyallerinin pek çok çeşidi kullanım alanı bul-

muştur. Ayrıca, çeşitli yöntemlerle elde edilen otolog ve allojenik kemik greft materyallerinin kullanılması ve uygun koşullarda saklanması amacıyla doku bankaları da kurulmuştur. Ancak, doku bankaları kurulması zor ve pahalı kurumlar olmakla birlikte, donör seçimi, elde edilen dokunun hazırlanması, sterilizasyonu ve allogreftlerin uygun koşullarda saklanması gibi konularda da halen kullanılmakta olan kesin bir protokol bulunmamaktadır. Bu gelişmelerin yanı sıra, son yıllarda allogreftlerin de bazı dezavantajlarının gözlenmesi, çalışmaların yapay greft materyalleri ve osteojenik materyaller üzerinde yoğunlaşmasına neden olmuştur.^[18-21]

Hidroksiapatit en çok denenilen ve farklı görüşlerin ortaya atıldığı malzemedir.^[18-24]

Hidroksiapatit, doğal kemik yapısında da bulunan kalsiyum ve fosfat iyonlarından oluşmaktadır. Yapısının

Tablo 7. Mann-Whitney U-testi sonucuna göre gruplar arası biyokimyasal parametlerin p değerleri

	PTH	Mg	P	Ca	HP
1. Hafta grup 1 (p)	0.002	0.304	0.945	0.002	0.454
1. Hafta grup 2 (p)	0.002	0.304	0.635	0.024	0.839
2. Hafta grup 1 (p)	0.024	0.839	0.142	0.304	0.008
2. Hafta grup 2 (p)	0.142	0.106	0.635	0.188	0.076
4. Hafta grup 1 (p)	0.713	0.875	0.958	0.118	0.713
4. Hafta grup 2 (p)	0.953	0.254	0.440	0.206	0.310

PTH: Pratiroid hormon; Mg: Magnezyum; P: Fosfat; Ca: Kalsiyum; HP: Hidroksiprolin.

kemiğe benzerlik göstermesi bu materyalin klinik başarisında etkin bir faktördür. Hidroksiapatit üzerinde yapılan çalışmalarda, yeni kemiğin implant yüzeyinde değil, kemikten ve osteogenesis özelliği olan periferel mezenkimal hücrelerden partiküller arasına doğru oluştuğu belirtilmiştir.^[23,24] Hidroksiapatitin osteoindüktif özelliği olmamasına karşın, kemik gelişimini yönlendirici özellikler gösterdiği öne sürülmektedir. Gelişmekte olan kemiği partiküller arası boşluğa doğru yönlendirerek bu işlevi görmektedir. Bu özelliği birçok araştırmacı tarafından osteokondüktif veya osteofilik olarak ifade edilmiştir.^[19-24]

Bunların dışında cyclooxygenase-2 inhibitör, ethanol, kalsitonin, diklofenak-sodyum gibi materyaller deneysel çalışmalarda kullanılmış ve sonuç olarak farklı görüşler ortaya çıkmıştır.^[26-30]

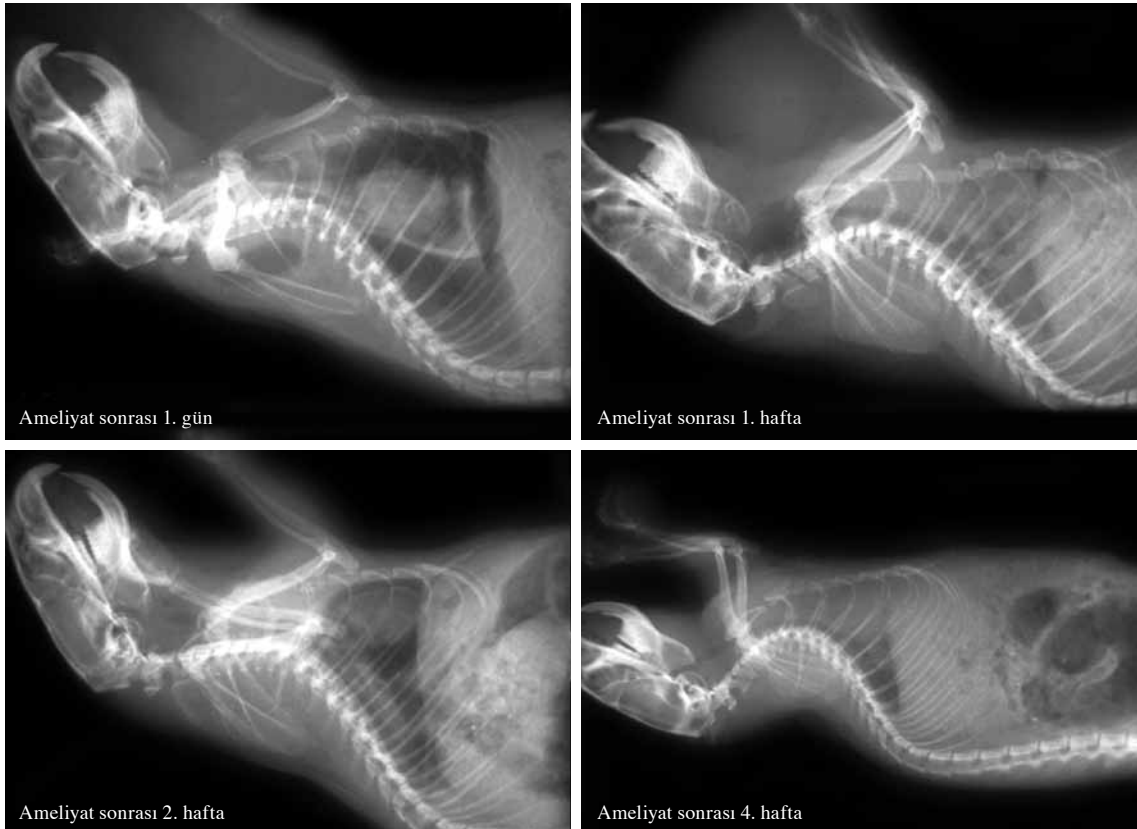
Sıçan kanında bulunan PTH, Mg, Ca, P ve HP düzeyleri hakkında bilgi olmadığı için, referans değer elde edebilmek için çalışma öncesi gruplardan bağımsız rasgele seçilen 10 denekten kan örnekleri alındı. Elde edilen biyokimyasal değerler, gruplar arası karşılaştırmada referans değer olarak kullanıldı.

Parathormon paratiroid bezleri tarafından üretilen, polipeptid yapısındaki hormondur. Vücutta kalsiyum metabolizmasını ayarlayan en önemli hormondur.

Parathormonun, osteoklast sayısını artırıcı, kemiğin yeniden şekillenmesini uyarıcı ve osteositleri uyarak osteolizi hızlandırıcı etkileri vardır. İnsülin ve büyüme hormonu gibi anabolizan hormonlar kırık iyileşmesini hızlandırmaktadır. Büyüme hormonu ve diğer anabolizan hormonlar, proteine bağlı kalsiyum artışını etkileyerek kırık iyileşmesine yardımcı olur. Büyüme hormonu, kallus hacminde artışa neden olur.^[2,3]

Hidroksiprolin, prolin türevidir, bitki hücre duvarı proteinlerinde ve bağ dokusunun fibröz proteini olan kollajende bulunur. Kemik kollajeninin yapısındaki önemli bir maddedir. Biyokimyasal değer olarak önemi; vücutta kemik kollajen döngüsünü gösterir. Kemik rezorpsiyonu için iyi bir göstergedir.^[2,3]

Kemik iyileşmesi sırasında normalde birkaç gün içinde inflamasyon ve osteoklastik aktivite artışına bağlı olarak, belirtilen parametrelerde fazla değişiklik beklenmez. Ancak bizim çalışmamızda birinci hafta sonunda bakılan örneklerde her iki grupta da PTH değerinde düşme gözlemlendi. Kalsiyum değerlerinde 1. hafta sonunda osteoklastik aktivasyona paralel olarak yükselme gözlemlendi. Birinci hafta sonunda meydana gelen biyokimyasal parametre değişiklikleri normal kemik iyileşmesi sırasında beklenen değişikliklerle paralellik göstermedi.



Şekil 1. Ameliyat sonrası 1. gün, 1., 2. ve 4. haftada röntgen görüntüsü.

Kırık iyileşmesinin tamir dönemine tekabül eden ikinci haftada PTH, Ca ve HP değerlerinde fazla olmamakla birlikte yükseklik, P değerinde göreceli düşüklük olması beklenir. Bizim çalışmamızda ise bu sürede biyokimyasal parametrelerin değerlendirilmesi incelendiğinde, ilginç olarak kontrol grubunda PTH değerinde, çalışma grubunda ise HP değerlerinde anlamlı düşüklük gözlemlendi.

Kallus oluşma dönemi genellikle kırık olan kemiğin yapısal özelliklerine bağlı olarak değişmekle birlikte kabaca 4. haftadan sonra başlar. Bu dönemde biyokimyasal parametrelerde PTH, HP, Ca değerlerinde artış, P değerinde düşme Mg değerinde ise farklı değişiklikler olması beklenir. Bizim çalışmamızda hiçbir parametrede istatistiksel olarak anlamlı değişiklik gözlemlenmedi, ancak parametrelerin değerlerine bakıldığında göreceli de olsa literatür bilgilerine paralel değişiklikler gözlemlendi.

X-ray incelemeler genellikle kal oluşum evresi olan 3-4 hafta sonra anlamlıdır. Bizim çalışmamızda deneklere çekilen X-ray incelemelerde; osteotomi hattında sternum üst ve alt periost çizgileri ve kalsifikasyon oluşumu yönünden gruplar arasında radyografik görüntüler açısından farklılık tespit edilmedi.

Sonuç olarak, yaptığımız çalışma ile İAS'nin kemik iyileşmesinde pozitif etki gösterdiği, bazı biyokimyasal parametrelerde osteotomi hattının iyileştiğini belirleyen anlamlılık tespit edildi. Diğer parametrelerde istatistiksel anlamlılık olmasa da iyileşme üzerinde olumlu katkı sağlayabileceği düşüncesi ile bu konuda daha geniş katılımlı çalışmalara gereksinim vardır. Bu veriler doğrultusunda, elde ettiğimiz histopatolojik ve biyokimyasal değerler incelendiğinde; insan amniyon sıvısı temini ve uygulanabilirliğinin kolay olması nedeni ile kırık iyileşmesinde kullanılabilecek alternatif ajanlar arasında değerlendirilebilir. Ancak bu konuyu daha net olarak ortaya koyabilecek daha detaylı çalışmalara gerek olduğu kanısındayız.

Çıkar çakışması beyanı

Yazarlar bu yazının hazırlanması ve yayınlanması aşamasında herhangi bir çıkar çakışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansman

Yazarlar bu yazının araştırma ve yazarlık sürecinde herhangi bir finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Genc O, Gurkok S, Gözübüyük A, Dakak M, Caylak H, Yücel O. Repair of pectus deformities: experience and outcome in 317 cases. *Ann Saudi Med* 2006;26:370-4.
2. Robbins SL, Kumar V, editors. *Basic pathology*. 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co.; 1987. Robbins SL, Kumar V.

3. Brown SG, Kramers PC. Indirect (secondary) bone healing. In: Bojrab MJ, editor. *Disease mechanisms in small animal surgery*. 2nd ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993. p. 671-7.
4. Remedios A. Bone and bone healing. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1999;29:1029-44.
5. Hulse D, Hyman B. Fracture biology and biomechanics. In: Slatter D, editor. *Textbook of small animal surgery*. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1993. p. 1595-603.
6. Johnson AL, Eurell JC, Losonsky JM, Egger EL. Biomechanics and biology of fracture healing with external skeletal fixation. *Compend Contin Educ Pract Vet* 1998;20:487-502.
7. Denny HR, Butterworth S. Fracture healing. In: Denny HR, Butterworth S, editors. *A guide to canine and feline orthopaedic surgery*. 4th ed. London: Blackwell Science; 2000. p. 3-17.
8. Skerry TM. Fracture healing. In: Coughlan AR, Miller A, editors. *Bsava manual of small animal fracture repair and management*. 1st ed. England: BSAVA; 1998. p. 29-42.
9. Perren SM. Primary bone healing. In: Smeak DD, Bojrab MJ, Bloomberg MS, editor. *Disease mechanisms in small animal surgery*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1993. p. 663-70.
10. Noyan A. Kemik dokusu ve kemikleşme. In: Noyan A, editör. *Yaşamda ve hekimlikte fizyoloji*. 10. baskı. Ankara: Meteksan Yayınları; 1998. p. 1046-7.
11. Burd DA, Greco RM, Regauer S, Longaker MT, Siebert JW, Garg HG. Hyaluronan and wound healing: a new perspective. *Br J Plast Surg* 1991;44:579-84.
12. Michalsky MP, Lara-Marquez M, Chun L, Besner GE. Heparin-binding EGF-like growth factor is present in human amniotic fluid and breast milk. *J Pediatr Surg* 2002;37:1-6.
13. Dahl LB, Kimpton WG, Cahill RN, Brown TJ, Fraser RE. The origin and fate of hyaluronan in amniotic fluid. *J Dev Physiol* 1989;12:209-18.
14. Longaker MT, Adzick NS, Hall JL, Stair SE, Crombleholme TM, Duncan BW, et al. Studies in fetal wound healing. VII. Fetal wound healing may be modulated by hyaluronic acid stimulating activity in amniotic fluid. *J Pediatr Surg* 1990;25:430-3.
15. Ozgenel GY, Samli B, Ozcan M. Effects of human amniotic fluid on peritendinous adhesion formation and tendon healing after flexor tendon surgery in rabbits. *J Hand Surg Am* 2001;26:332-9.
16. Kerimoğlu S, Livaoglu M, Sönmez B, Yuluğ E, Aynaci O, Topbas M, et al. Effects of human amniotic fluid on fracture healing in rat tibia. *J Surg Res* 2009;152:281-7.
17. Ozgenel GY, Filiz G, Ozcan M. Effects of human amniotic fluid on cartilage regeneration from free perichondrial grafts in rabbits. *Br J Plast Surg* 2004;57:423-8.
18. Karaçal N, Koşucu P, Cobanglu U, Kutlu N. Effect of human amniotic fluid on bone healing. *J Surg Res* 2005; 129:283-7.
19. Develioglu H, Unver Saraydin S, Kartal U. The bone-healing effect of a xenograft in a rat calvarial defect model. *Dent Mater J* 2009;28:396-400.
20. Jacobsson SA, Djerf K, Ivarsson I, Wahlström O. Effect of diclofenac on fixation of hydroxyapatite-coated implants. An experimental study. *J Bone Joint Surg [Br]* 1994;76:831-3.

21. Özcan A, Yüncü M, Dalkız M, Yapar M. Kemik defektlerinin iyileşmesinde Hidroksilapatitin etkisinin değerlendirilmesi (Deneyisel çalışma). *T Klin Diş Hek Bil* 2000;6:138-44.
22. Overgaard S, Søballe K, Lind M, Bünger C. Resorption of hydroxyapatite and fluorapatite coatings in man. An experimental study in trabecular bone. *J Bone Joint Surg [Br]* 1997;79:654-9.
23. Wang G, Yang H, Li M, Lu S, Chen X, Cai X. The use of silk fibroin/hydroxyapatite composite co-cultured with rabbit bone-marrow stromal cells in the healing of a segmental bone defect. *J Bone Joint Surg [Br]* 2010;92:320-5.
24. Benlidayi ME, Kürkcü M, Oz IA, Sertdemir Y. Comparison of two different forms of bovine-derived hydroxyapatite in sinus augmentation and simultaneous implant placement: an experimental study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009; 24:704-11.
25. Canetti AC, Colombo CE, Chin CM, Faig-Leite H. Femur bone repair in ovariectomized rats under the local action of alendronate, hydroxyapatite and the association of alendronate and hydroxyapatite. *Int J Exp Pathol* 2009;90:520-6.
26. Herbenick MA, Sprott D, Stills H, Lawless M. Effects of a cyclooxygenase 2 inhibitor on fracture healing in a rat model. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)* 2008;37:E133-7.
27. Nyquist F, Halvorsen V, Madsen JE, Nordsletten L, Obrant KJ. Ethanol and its effects on fracture healing and bone mass in male rats. *Acta Orthop Scand* 1999;70:212-6.
28. Esenyel M, Bülbül M, Esenyel CZ, Kara AN, Bilgiç B. Kalsitoninin kırık iyileşmesi üzerine etkisi: histopatolojik ve radyografik deneysel çalışma. *Türk Fiz Tıp Rehab Derg* 2005;51:6-8.
29. Bulbul M, Esenyel CZ, Esenyel M, Ayanoglu S, Bilgic B, Gulmez T. Effects of calcitonin on the biomechanics, histopathology, and radiography of callus formation in rats. *J Orthop Sci* 2008;13:136-44.
30. Akman Ş, Göğüş A, Şener N, Bilgiç B, Aksoy B. Sıçan tibya kırıkları sonrası uygulanan diklofenak-sodyumun kırık kaynaması üzerine etkileri: deneysel çalışma. *Hacettepe Ortopedi Dergisi* 2001;11:55-60.