

Medulla Spinalis Yaralanmasının Kırık İyileşmesi Üzerindeki Etkisi (Sıçanlarda Deneysel Çalışma)

Adil Turan¹, Fehmi Doruk Kuran², Ferhat Güler¹, Ebru Sezer³, Yigit Uyanıkgil⁴,
Osman Arslan Bora⁵

¹ Antalya Eğitim Araştırma Hastanesi, Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği, Antalya

² Özel Bornova Tıp Merkezi, İzmir

³ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir

⁴ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir

⁵ Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, İzmir

Özet

Spinal travma sonrası oluşan sinir iletim kaybı zemininde gelişen kırıklarda iyileşme ve kemik metabolizması normalden farklılıklar göstermektedir. Sinir iletiminin kesintiye uğramasının kemik metabolizması ve kırık iyileşmesini ne yönde etkilediğini araştırmak ve konu ile ilgili mekanizmalar geliştirmek amacı ile bu deneysel çalışma planlandı. Kırık beş adet Wistar albino cinsi sıçan randomize olarak 3 gruba ayrıldı. Grup 1'de (n=20) lomber seviyeden spinal travma sonrası sağ tibia da kapalı kırık oluşturuldu. Grup 2'de (n=20) spinal travma olmadan kırık meydana getirildi. Grup 3'te (n=5) ise hiçbir müdahale yapılmamış sıçanlar kullanıldı. Çalışmanın 35. gününde sıçanlar sakrifiye edilerek kan örnekleri alındı ve kırık ekstremiteleri çıkartıldı. Materyeller histopatolojik ve biokimyasal olarak incelendi. Grup 1'de ameliyat sonrası anlamlı derecede kilo kaybı tespit edildi ve kemik yapımını gösteren kan ve kallus BALP düzeyleri yüksek saptandı. Kallus kalsiyum düzeylerinde ise anlamlı şekilde azalma tespit edildi. Kemik yıkım belirteci olarak kullanılan hidroksiprolin düzeylerinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Yapılan histopatolojik çalışmada ise, kallus boyutunun travma grubunda diğer gruba oranla anlamlı derecede fazla olduğu görülürken, matürasyon derecesinin ise kontrol grubuna göre geride olduğu tespit edildi. Spinal travma nedeniyle oluşan sinir iletimindeki kesintinin, kırık iyileşmesinin mineralizasyon fazını olumsuz yönde etkilemesine karşın kallus boyutunda artışa neden olmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Kırık iyileşmesi, spinal travma, BALP.

(Rec.Date: Jan 28, 2013 - Accept Date: Mar 19, 2013)

Corresponding Author: Op Dr. Adil Turan, Antalya Eğitim Araştırma Hastanesi, Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği, Antalya, Türkiye

E-mail: adilturan@yahoo.com

Effects of Medulla Spinalis Injury on Fracture Healing

Adil Turan¹, Fehmi Doruk Kuran², Ferhat Güler¹, Ebru Sezer³, Yigit Uyanıkgil⁴,
Osman Arslan Bora⁵

¹ Antalya Education and Research Hospital, Clinic of Orthopedics and Traumatology, Antalya

² Bornova Private Medical Center, Izmir

³ Ege University Faculty of Medicine, Department of Biochemistry, Izmir

⁴ Ege University Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology, Izmir

⁵ Katip Celebi University, Faculty of Medicine, Department of Orthopedics and
Traumatology, Izmir

In fractures developing on the basis of the nerve conduction loss occurring after spinal trauma, healing and bone metabolism demonstrate departure from normal. The objective of this study is to study the type of effect which the interruption in the nerve conduction has on bone metabolism and bone healing and to develop relevant mechanisms. Forty-five Wistar Albino rats were randomized and divided into 3 groups. In Group 1 (n=20), a close fracture was created at the right tibia following spinal trauma at the lumbar level. In Group 2 (n=20), a fracture was created without spinal trauma. Finally, Group 3 (n=5) was made up of rats with no intervention. On the 35th day of the study, rats were sacrificed; blood samples were taken and fractured extremities were removed. Materials were histopathologically and biochemically examined. Significant weight loss was detected postoperatively in Group 1. In the same group, blood and callus BALP levels indicating bone formation were observed to be high. A significant decrease was also identified in callus calcium levels. Employed as a determinant of bone resorption, hydroxyproline levels did not demonstrate any significant differences. On the other hand, upon histopathological examination, callus size was observed to be significantly larger in the trauma group than in the other group, while the degree of maturation was lower than that of the control group. Interruption of nerve conduction induced by spinal trauma is observed to give way to an increase in callus size, despite its negative effect on the mineralization phase of bone healing.

Key Words: Fracture healing, spinal injury, BALP

(Rec.Date: Jan 28, 2013

Accept Date: Mar 19, 2013)

Giriş

Spinal kord yaralanmalarının oluş sıklığı son yıllarda artış göstermektedir. Bu yaralanmalar kuadripleji ve parapleji ile sonuçlandığında geçmişte erken ölüm kaçınılmazdı. Tedavi alternatiflerinin çoğalması ve artan organize rehabilitasyon programları hastaların daha uzun ve fonksiyonel yaşamasına imkan vermektedir [1]. Ancak bu hastalarda spinal travmayla eş zamanlı veya oluşan hasarın uzun dönem etkileri sonucu meydana gelen kemik yıkımı sonrası, uzun kemik kırıkları sık görülmektedir [2]. Bu yaralanma zaten az olan aktivitenin daha da kısıtlanmasına, sakatlığın kötüleşmesine, rehabilitasyon tedavi programının uygulanmasında zorluğa ve basınç yaraları, kırık sahasında kemik enfeksiyonu, otonom sinir sistemindeki bozulmaya bağlı hipertansif kriz, venöz tromboembolizm gibi birçok medikal komplikasyonun eklenmesine neden olmaktadır [3]. Bu nedenle spinal travma ile beraber veya sonrasında meydana gelen uzun kemik kırıklarının tedavisi büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada sinir iletiminin kesintiye uğramasının kemik metabolizması ve kırık iyileşmesini ne yönde etkilediği ve konu ile ilgili mekanizmaların geliştirilmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

Çalışma ağırlık ortalaması 380 gr (320–430) ve yaş ortalaması 9 ay olan 45 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan ile yapıldı. Sıçanlar oda ısısında, biyolojik ritme uygun olarak 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ortamda, standart laboratuvar yemi ve çeşme suyu verilerek beslendi. Çalışma süresince kenarları sert plastik ve üstünde çelik ızgara bulunan deney grubuna göre numaralandırılmış kafeslerde (19x12x12 cm) ağırlık takibi yapılmak amacıyla tek başlarına tutuldu. Çalışmaya başlamadan önce gerekli etik kurul onayı alındı.

Kırk beş adet sıçan rastlantısal olarak 3 gruba ayrıldı. Birinci grup spinal travma ve kırık grubu (n=20), 2. grup yalnızca kırık oluşturulan grup (n=20) ve 3. grup ise aynı koşullarda beslenmiş ve barınmış ancak hiçbir müdahale yapılmamış sıçanların bulunduğu grup (n=5) (İntakt kontrol) olarak belirlendi. Tüm sıçanlara profilaktik amaçla 30mg/kg Sefazolin Na (Cefazol®) intraperitoneal olarak uygulandı.

Her bir sıçanın ağırlığı elektronik hassas tartı (Precia XB-220A) ile ölçüldü. Tüm deneklere intraperitoneal olarak verilen 35mg/kg Ketamin HCl (Alfamine®) ve 5mg/kg Ksilazin HCl (Alfazyne®) ile anestezi sağlandı ve operasyon sonrasında olası sıvı ve kan kaybını yerine koymak amaçlı 30ml/kg izotonik intraperitoneal uygulandı.

Original Research

Deneklere genel anestezi sonrası sırt ve diz bölgesi traş edilerek Polyvidon iyot (Batticon, Adeka ®, Samsun) ile lokal antisepsi uygulandı ve vertebra üzeri steril örtülerle örtüldü. Üst Lomber seviyeden spinal travma oluşturulacaklara Th12-L4 seviyesinden cilt, cilt altı insizyon yapıldı. Paravertebral fasya geçilerek kaslar laterale künt disseksiyonla sıyrıldı. L1-3 laminaları görülerek total laminektomi uygulandı. Daha sonra 1. gruptaki deneklere Rivliv ve Tator'un klip yöntemi ile kapanma basıncı 50 gram olan anevrizma klipsi (Yaşargil, FE 619K, Aesculap AG, Almanya) yerleştirilerek extradural olarak spinal travma oluşturuldu [4] (Şekil-1). Klips bir dakika süre ile tutuldu. Hemostazı takiben katlar anatomisine uygun olarak keskin iğneli 3/0 ipek (Sterisilk®, Türkiye) ile kapatıldı. İkinci gruptaki deneklere spinal travma oluşturulmadan yalnızca laminektomi yapıldı.



Şekil 1. Extradural olarak spinal travma oluşturulması.

Birinci ve 2. gruptaki deneklerin sağ dizleri serum lastiği ile fleksiyonda sabitlendi. Bonnarens ve Einhorn'un tanımladığı şekilde tibia proksimalden kanal içerisine 0.6 mm'lik Kirschner teli (Hipokrat®, İzmir, Türkiye) gönderildi [5] (Şekil-2). Telin sıkıştığı yerde tel 3-4 mm kadar geri çekilerek tibia kondilleri hizasından kesildi. Ayak bileği ve diz hareketleri kontrol edilerek herhangi bir eklem penetrasyonu olup olmadığına bakıldı. Her iki gruptaki

Original Research

deneklerin sağ tibiaları yine Bonnarens ve Einhorn'un tanımladığı şekilde özel tasarlanmış bir cihazla 3 nokta prensibine uygun olarak künt travma ile 1/3 orta bölgeden basit kapalı kırık oluşturuldu (Şekil-3).

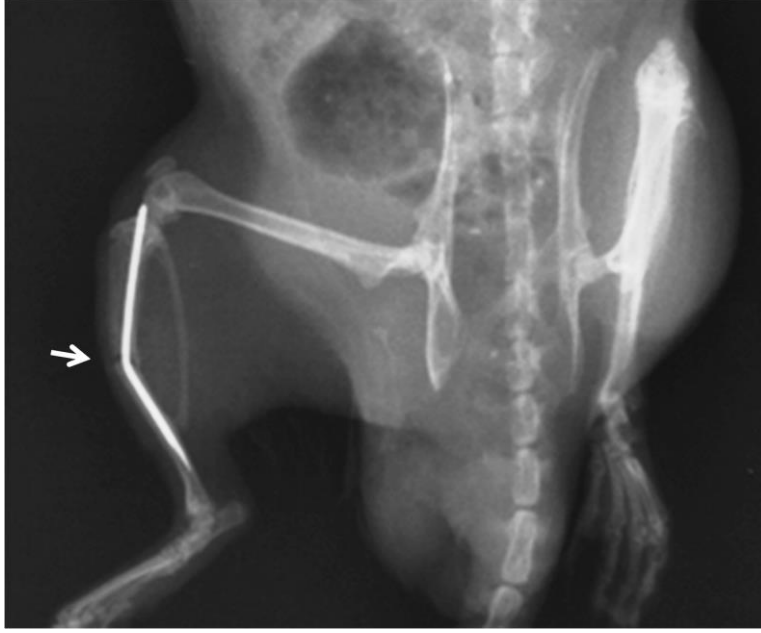
Rotasyonu ve dizilimi kalça diz ve ayak bileğinin dizilimi ve karşı ekstremita ile karşılaştırılarak yapıldı. Standart kırık varlığı ameliyat sonrası çekilen grafilerle tespit edildi (Şekil-4). Uygun dizilimde olmayan kırıklar çalışma dışı bırakıldı.



Şekil 2. Tibiyaya proksimalden kanal içerisine Kirschner telinin gönderilmesi.



Şekil 3. Üç nokta prensibine uygun olarak künt travma ile basit kapalı kırık oluşturulması.



Şekil 4. Standart kırık varlığının ameliyat sonrası çekilen grafilerle tespiti.

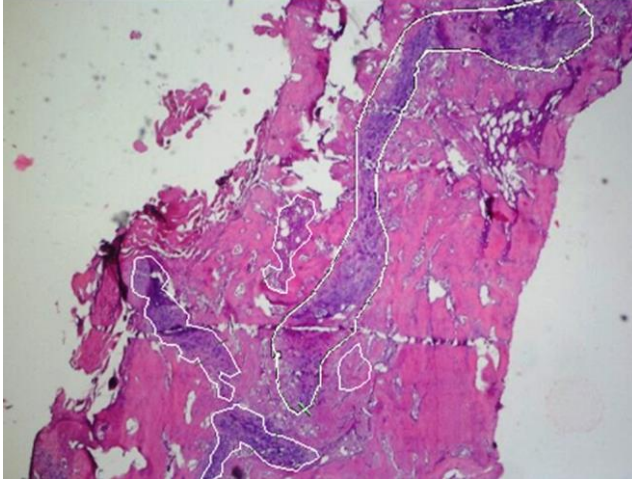
Spinal kord lezyonu oluşturulup paraplejik hale gelen sıçanların mesaneleri, kendileri boşaltana kadar ilk 1-2 hafta günde en az 4 kez el ile olarak boşaltıldı. Yine paraplejik ratların alt ekstremiteleri hareketsiz olduğundan yemler ıslatılarak petri kaplarına yerleştirilip kafes içerisine kondu. Alt ekstremitelerinde bası yaralarının oluşmasını engellemek amaçlı günde 2 kez masaj yapılarak kan dolaşımı hızlandırıldı.

Tüm sıçanlar 35 gün sonra 100 mg/kg Tiopental Sodyum intraperitoneal verilerek sakrifiye edildi. Ağırlıkları kaydedildi. Hepsinden intrakardiyak alınan kan örnekleri EDTA'lı biyokimya tüpünde saklandı. Alt ekstremiteler diz ekleminde dezartiküle edilerek kallus dokusuna zarar vermeden çevre yumuşak dokular temizlendi. Elde edilen materyaller histopatolojik inceleme için formol içerisinde, biyokimyasal inceleme için serum fizyolojik içerisinde muhafaza edildi.

Biyokimyasal Değerlendirme: Sakrifikasyondan hemen sonra elde edilen kemik ve kallus örnekleri alüminyum folyolara sarılarak, kan örnekleri ise santrifüj edildikten sonra plazmalarına ayrılarak çalışma tarihine dek -80°C'de saklandı. Testin yapılacağı zaman tüm örnekler oda sıcaklığında erimeye bırakıldı. Daha sonra kemik ve kallus örnekleri ağırlıkları ölçülüp ince bir pudra halini alıncaya kadar havanda dövüldü. Kalsiyum düzeyleri ticari Calcium Arsenazo III kolorimetrik test kitiyle gerçekleştirildi (randox calcium arsenazo III testi). Hidroksiprolin ölçümü kemik ve kallus örneklerindeki kollajen miktarını belirlemek için Bergman ve Loxley'in metodlarının (1963) [6] modifikasyonu ile gerçekleştirildi. Kallus

dokusu 7M HCl ile 6 saat boyunca 110°C de inkübe edildi. Hidrolizat 4000g de santrifüj edildikten sonra 1ml supernatant 4 ml 4.8w / v% LiOH ve 0,1ml 7M HCl (37,5 mg doku/ml 7M HCL) ile nötralize edilip temiz tüplere aktarıldı. 1ml isopropanol ve 0,5 ml chloramin T solusyonu her örnek ve standart tüpüne eklenerek vortekslendi. Dört dakika sonra 1 ml Ehrlich reaktifi eklenip 60°C’de 20 dk inkübe edildi. Oda sıcaklığına geldiğinde 256 nm’de reaktif körüne karşı okundu. Standart olarak hidroksiprolin kullanıldı [6,7,8]. Elde edilen sonuçlar nmol/ g kallus olarak verilmiştir. Homojenize edilen örneklerden rat kemik alkalen fosfataz ölçümleri, BALP (kemik spesifik alkalen fosfataz) ticari eliza kiti ile yapıldı (Uscnlife Science & Technology Co. Ltd).

Histolojik değerlendirme: Tüm örnekler %10 tamponlu formalin içinde 24 saat fikse edildi. Uygun şekilde alınan örnekler %10’luk Formaldehit ve %20’lik formik asit ile hazırlanan dekalsifikasyon solüsyonu içerisinde haftalık olarak enjektör ucu ile yumuşama kontrolü yapılarak yaklaşık 2 ay süre ile bu işleme tabi tutuldu. Alkol ve ksilol serilerinden geçirilip histolojik takipten geçen dokular daha sonra mavi boncuk parafin eriyiğine gömülerek bloklandı. Işık mikroskopik kesitler için Leica RM 2145 model mikrotomda kırık hattı merkezli 5 µ’luk kesitler 45°C’lik su banyosuna alındı. Kesitlerin lama iyice yapıştırılması ve parafin uzaklaştırma işlemlerinde mikrodalga fırın (Arçelik MD554) kullanıldı. Tüm gruplardan elde edilen histolojik preparatlarda uygun histokimyasal (Hematoksilen& Eosin) boyama gerçekleştirildi. Doku kesitleri ışık mikroskobunda (Olympus BX51) X10, X20, X40 büyütmelemlerde incelendi. İyileşmenin histolojik olarak değerlendirilmesi iki farklı yöntemle yapıldı. İlk olarak her deneğe ait preparatlardan 3’er adet rastlantısal alan incelenerek x40’lık büyütmede fibröz doku, kıkırdak doku, immatür ve matür kemik oranlarına bakıldı ve Huo ve ark.’nın önerdiği sisteme göre skorlandı [9]. Diğer yöntem ise her deneğe ait prepatatlardan üçer adet rastlantısal alan seçilerek meydana gelişmiş olan iyileşme dokusunun Image-Pro Express 4.5 (Media Cybernetics, Inc. USA) programı kullanılarak mikrometrekare cinsinden alanları hesaplandı (Sekil-5).



Şekil 5. İyileşme dokusunun Image-Pro Express 4.5 programı kullanılarak hesaplanması.

İstatistiksel Değerlendirme: Analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 17.0 programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (ortalama, standart sapma, min, max değer) yanı sıra niceliksel verilerin gruplararası karşılaştırılmasında Kruskal Vallis testi, grupların ikili karşılaştırmalarında ise Mann-Whitney U testi kullanıldı. Sonuçlar %95 güven aralığında $p < 0.05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı, $p > 0.05$ istatistiksel anlamsız olarak değerlendirildi.

Bulgular

Travma grubundan 2 sıçan, kontrol grubundan ise 1 sıçan anestezi uygulanması sırasında kaybedildi. Travma grubundan 1 sıçan yara yeri enfeksiyonu nedeniyle, her iki gruptan birer sıçanda standart kırık oluşturulamadığı için çalışma dışı bırakıldı. Sonuçta travma grubu 17 denek, kontrol grubu 18 denekle çalışmayı tamamladı.

Ameliyat öncesi ve sonrası ölçülen ağırlıklarda travma grubunda kontrol grubuna göre daha fazla kilo meydana geldi. Bu kayıp travma grubunda ortalama 114,81gr iken, kontrol grubunda 20,53 olarak tespit edildi. Aradaki bu fark anlamlı bulundu ($p < 0.05$).

Grup 1 ile grup 2 arasında kan BALP düzeyleri bakımından anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0.05$). Ancak Grup 3 ile hem grup 1 hemde grup 2 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi ($p_1 < 0.05$ ve $p_2 < 0.05$)

Kallus dokusundaki BALP düzeyinde ise en yüksek değer grup 1 de tespit edilmiştir. En düşük değer ise grup 3'de bulunmuştur. Yapılan değerlendirmelerde hem üç grup arasındaki

hem de gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p_1 < 0.05$, $p_2 = < 0.05$, $p_3 < 0.05$ ve $p_4 < 0.05$).

Spinal travma grubunun (Grup-1) ve kontrol grubunun (Grup-2) kendi içerisinde kan ve kallus BALP düzeyleri arasında oldukça büyük bir fark tespit edilmiştir (Tablo-1).

Tablo 1. Spinal travma grubunun (Grup-1) ve kontrol grubunun (Grup-2) kendi içerisinde kan ve kallus BALP düzeyleri arasında karşılaştırılması.

	BALP Düzeyi	Ort ± SS	Min – Maks
TRAVMA GRUBU	Kan	32,75 ± 18,30	11,6 - 81,2
	Kallus Dokusu	1114,12 ± 262,65	694,4 - 1463,8
KONTROL GRUBU	Kan	29,97 ± 8,7	14,85 - 48,87
	Kallus Dokusu	845,05 ± 266,99	552,46 - 1243,2

Kallus Ca düzeyi en yüksek intakt kontrol grubundaki sağlam kemikte elde edilmiştir ($5,92 \pm 0,42$ mol/g/kallus). Bu sonuçla diğer gruplarda bulunan sonuçlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). En düşük Ca değeri de grup 1’de bulunmuştur ($2,45 \pm 0,40$ mmol/g/kallus).

Kallus hidroksiprolin düzeyi en yüksek intakt kontrol grubunda tespit edilmiştir ($593,00 \pm 44,50$ nmol/g kallus) ve diğer iki grupta ki değerler ile bunun arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Ancak grup 1 ile grup 2 arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$).

Her iki grupta oluşan kallus alanları ölçülmüş ve grup 1’de istatistiksel olarak anlamlı bir yükseklik tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Ayrıca bu alanların ışık mikroskopisi ile incelenmesinde kallus alanlarının grup 2’de, Grup 1’e oranla daha dağınık yerleşimde olduğu görülmüştür. Ancak Huo ve ark.’nın skalasına göre yapılan değerlendirmede grup 1 ‘de iyileşme evresinin daha geri olduğu, grup 2’de ise daha iyi bir kırık iyileşmesi tespit edilmiştir.

Tartışma

Sağlam bir sinir sisteminin, kırık iyileşmesindeki ve kemik metabolizmasında ki rolü daha önce yapılan birçok çalışmada açıklanmaya çalışılmıştır. Laboratuvar koşullarında elektrik

uyarının kallus hücreleri ve lenfositlerde dinlenme safhasındaki DNA sentezini aktive ettiği, buna karşın çoğalmakta olan aktif hücreleri ise inhibe ettiği, çoğalmalarını engelleyici yönde etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu ise sinir iletimi, kesilmiş olan kırıklarda sinir sisteminin kallus hücreleri üzerindeki negatif etkisi ortadan kalktığı için kallus boyutlarında artış meydana geldiği şeklinde yorumlanmaktadır [10]. Li ve Ahmad yaptıkları çalışmada kırık iyileşmesinin erken döneminde sinir yenilenmesinin yoğun olduğunu göstermişlerdir [11]. Bu ve benzer çalışmalar kırık iyileşmesinin düzenlenmesinde sinir uyarılarının ne denli önemli bir rolü olduğunu göstermektedir.

H. Aro ve arkadaşlarının iyileşmenin erken fazında omurilik travmalı sıçanların kontrollerine göre, düzensizlikler içeren, radyolojik olarak düşük yoğunluğa sahip kalluslar geliştirdiğini ve ancak yaptıkları biyomekanik çalışmada çekme dayanımlarının anlamlı şekilde artmış olduğunu göstermişlerdir [12]. Al-Harby ve Samy köpekler üzerinde yaptıkları çalışmada brakial pleksus lezyonu yaratıp aynı ekstremitede açık kemik kırığı oluşturarak plak ile osteosentez sağlamışlar ve deneklerin etkilenen uzuvlarına hiç yük vermediklerini gözlemlemişler [13]. Onbeşer gün aralıklarla yaptıkları radyolojik değerlendirmede, deney grubunda iyileşmede gecikme ve yavaş gelişen atrofik bir kallus tespit etmişlerdir. Bu sonuçların H. Aro ve arkadaşlarının hızlı kaynama ve büyük kallus oluşumu şeklinden ki sonuçları ile çelişmekte olduğunu gördüler [12,14,15]. Kendi bulgularının Sarmiento ve arkadaşlarının da tariflediği gibi ağırlık vermemeleri ve azalmış yüklenme sonucunda meydana gelmiş olabileceğini söylediler. Mekanik yüklenme periostal kemik yapımını ve kırık çevresindeki mikro ve makro vasküler dolaşımı arttırarak iyileşme ve yeniden şekillenmeyi pozitif yönde etkilemektedir [16]. Ancak yukarı kısımda da belirtildiği gibi bu amaçla yapılan kalça luksasyonu ve alçı uygulamaları hiçbir zaman tam yüksüzlük sağlamamaktadır. Bu konuyla ilgili uzun dönem paraplejik hastalarda yapılmış klinik çalışmalar mevcut olup hepsi kullanılmamanın ve denervasyonun kemik mineralizasyonunda azalmaya yol açtığını göstermektedir [2,17,18,19].

Kırık iyileşmesinin derecesini, kallus yapısının kalitesini ve kemik metabolizmasındaki değişiklikleri tespit etmek amaçlı birçok farklı teknik kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan biyokimyasal testlerde çalışılan parametreler, kemik yapımı ve yıkımı hakkında bilgi vermektedir. Bu parametrelerin çoğu serumda ve idrarda, bir kısmı ise kallus veya kemik dokusu içerisinde araştırılmaktadır [20,21]. Karaciğer ya da safra yollarına ait bir rahatsızlığı olmayan bireylerde kemik yapımı hakkında güvenilir bir gösterge olarak total alkalen fosfataz kullanılabilir. Ancak özellikle deneysel araştırmalarda veya daha spesifik ölçüm gerektiren

hastalıkların tanısında alkalen fosfatazın alt izoenzimi olan kemik spesifik alkalen fosfataz ölçümü kullanılmaktadır [22,23,24,25,26] yaptığımız çalışmada bu yöntemi izledik.

Ameliyat öncesi ve sakrifikasyon sonrası ölçülen ağırlık değerlerinde spinal travma grubunda (Grup 1) anlamlı düzeyde kilo kaybı tespit edildi. Bu, hareket kabiliyetleri kısıtlanan deneklerin, yemek ve suya ulaşmalarındaki zorluklarla kısmen açıklanabilir. Kaşeksinin kırık iyileşmesini hem mekanik yüklenme kuvvetinin azalmasıyla hem de besin ve vitamin eksikliğine bağlı kemik biyolojisinin bozulmasıyla olumsuz etkilediğini düşünülmekte [27]. H. Aro ve ark.'ı bu çalışmada elde edilen kilo kaybına yakın bir değer elde etmelerine rağmen spinal travma grubunda hızlı kırık iyileşme bulgularını şaşırtıcı bulmuşlar, bunu kilo kaybıyla bağlantılı olmayan farklı faktörlerin iyileşmeyi etkileyebileceği sonucuna varmışlardır [14].

Histopatolojik değerlendirmede elde edilen gruplar arası kallus boyutlarındaki ve iyileşme evrelerindeki farklılık ilgi çekicidir. Spinal travma grubunda anlamlı şekilde büyük bir kallus elde edilmişken, iyileşme evresi daha düşük bir matürasyon sergilemektedir. Tüm çalışmalarda olduğu gibi bu çalışmada da iki grubun mekanik ortamları aynı değildir [28]. Paraplejik sıçanlarda hareketin daha kısıtlı olması nedeniyle kırık sahasındaki kallus boyutunun daha az olmasını beklerken tam tersi bir sonuç elde edilmesi iki farklı şekilde açıklanabilir; birincisi; paraleji nedeniyle alt ekstremitelerinde ağrı hissi kaybolan denekler, bu hissin devam ettiği kontrollerine göre ön uzuvları ile daha rahat gövde hareketi yapmaktalar ve bu da kırık sahasında kontrolsüz harekete neden olmakta. İkinci varsayım ise yine yukarıda açıklandığı gibi kallus dokusu üzerinde baskılayıcı etkisi bulunan sinir uyarılarının kesilmesiyle kontrolsüz kallus oluşumu meydana gelmektedir [29]. Kallus boyutundaki bu büyümeye rağmen kemik matürasyonunun daha çok fibröz, az oranda da kartilajenöz evrede kalmış olması iyileşme biyolojisinin zayıf olduğunu ve kallus büyüklüğünün mekanik faktörlerden daha fazla etkilendiğini desteklemektedir [30].

Her iki grupta da Huo ve ark.'nın iyileşme skalasında göre tam, matür iyileşmiş kemik dokusunun tespit edilmemiştir. Bu bulgu grupların kendi içlerinde yakın iyileşme evresinde olduğunu, buna karşın benzer çalışmalardaki iyileşme evrelerine göre geride kaldıklarını görülmektedir. Bunun olası nedenleri arasında çalışmamızda planladığımız deney süresinin, kırıkta tam iyileşme oluşturmaya yetmemesi olabilir. Sıçanlarda iyileşmenin değerlendirilmesi için operasyon sonrası 4-5 hafta bekleyen çalışmalar olduğu gibi daha uzun dönem sonuçların yayınlandığı çalışmalarda bulunmaktadır [11,12,14,15,19,31]. İnsanlar üzerinde yapılan geriye dönük çalışmalarda da spinal travmanın kemik üzerinde ciddi bir yıkıma neden olduğu gösterilmiştir [17,19]. Ancak deneysel spinal travmanın ağırlığından dolayı deneklerin

yaşatılmasında karşılaşılan sorunlar bizim ve bizim gibi benzer çalışmaların kısıtlayıcı yönlerini oluşturmaktadır. Daha iyi bir post op bakım ve izlem ile oluşabilecek komplikasyonlar önlenebilirse daha uzun dönemdeki iyileşme sonuçları değerlendirilebilir.

Spinal travmalı grupta kallus dokusunda elde ettiğimiz düşük kalsiyum düzeyleri mineralizasyonun yetersizliğinin bir göstergesidir. Aynı zamanda histopatolojik değerlendirmedeki kıkırdak ve fibröz doku baskınlığını da kısmen açıklamaktadır. Bazı çalışmalarda gösterildiği gibi spinal travma sonrası kandaki yüksek kalsiyum değerleri ile bizim bulduğumuz düşük doku kalsiyumu arasındaki çelişki, iyileşmenin yalnız mekanik faktörlerle değil sistemik hormonal düzeyde de etkilendiğini göstermektedir [17,18,32].

Kanda ve kallus dokusunda ölçülen BALP düzeyleri, kırık oluşturulan gruplarda intakt kemik grubuna oranla anlamlı derecede yüksek seyretmektedir. Bu durum kemik yapım aktivitesinin etkin şekilde işlediğini göstermektedir. Buna karşın, spinal travmalı grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında grup 1 de daha yüksek değerler göze çarpmaktadır. Bu bulgular literatürle uyumludur ancak bizim çalışmamızda elde ettiğimiz fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır [17,22,33,34].

Literatürde spinal travma sonucu oluşan denervasyonun kemik yıkımını belirgin şekilde arttırdığı konusunda fikir birliği mevcut iken, bunu biyokimyasal olarak kanıtlamak için kullanılacak parametreler konusunda çelişkili görüşler mevcuttur [17,20,21,24,35]. Serum hidroksiprolin seviyesi, kollajen metabolizmasının yıkım yönünde bir göstergesi olarak düşünülmekle beraber hiperparatiroidi, hipertiroidi, paget hastalığı, yanıklar, kemik metastazları v.b. diğer bazı patolojiler sonucunda da düzeylerinin artış göstermesi ayrıca gıdalarla alınan kollajen ve jelatinden etkileniyor olması bu konudaki güvenilirliğini azaltmıştır [35]. H. Aro ve arkadaşları hidroksiprolinin kallus dokusundaki düzeylerini araştırdıkları çalışmalarında, denerve ve normal ekstremiteler arasında anlamlı bir fark tespit edememişlerdir [15]. Çalışmada elde edilen sonuçlar bununla uyumlu gözükmektedir. Buna karşın iyileşme dokusunda yüksek hidroksiprolin düzeyleri tespit edilen çalışmalarda mevcuttur. Sonuç olarak kemik yıkımının değerlendirileceği çalışmalarda idrar ve doku hidroksiprolin düzeyinin yanında diğer yıkım belirteçlerinin de bakılması sonuçların güvenilirliğini arttıracaktır [19,20,21,35].

Sonuç olarak spinal travma nedeniyle oluşan sinir iletimindeki kesintinin, kırık iyileşmesinin mineralizasyon fazını olumsuz yönde etkilemesine karşın kallus boyutunda artışa neden olduğu görülmektedir. Bu durum, büyük ancak zayıf bir kallus dokusuyla, geç iyileşen kırıkların meydana geldiğini göstermektedir. Elde ettiğimiz bu sonuç ile günlük pratiğimizde

paraplejik ya da kuadrolejik durumdayken kırık meydana gelen hastalara, kallus mineralizasyonunu arttırıcı, kalsiyum metabolizmasını düzenleyici tedaviler verilmesi ile hem daha kaliteli bir kalus dokusu elde edilir hemde hızlı bir kaynama meydana getirilebilir.

KAYNAKLAR

1. Eichenholtz S. Management of long bone fractures in paraplegic patients. J Bone Joint Surg Am. 1963;45(2):299-310.
2. Morse L, Teng YD, Pham L, Newton K. Spinal cord injury causes rapid osteoclastic resorption and growth plate abnormalities in growing rats (SCI-induced bone loss in growing rats). Osteoporos Int. 2008;19:645-52.
3. Aro H, Eerola E, Aho AJ. Fracture healing in paraplegic rats. Acta Orthop Scand. 1985;56:228-32.
4. Rivlin AS, Tator CH. Effect of duration of acute spinal cord compression in new acute cord injury in the rat. Surg Neurol. 1978;10:39-43.
5. Bonnarens F, Einhorn TA. Production of the standard closed fracture in laboratory animal bone. J Orthop Res. 1984;2(1):97-101.
6. Bergman I, Loxley R. Two improved and simplified methods for spectrophotometric determination of hydroxyproline. Anal Chem. 1963;35:1961-5.
7. Takahashi M, Hoshino H, Kushida K, Inoue T. Direct measurement of crosslinks, pyridinoline, deoxypyridinoline and pentosidine in the hydrolysate of tissues using high performance liquid chromatography. Anal Biochem. 1995;232:158.
8. Eyre DR, Koob TJ, Van Ness KP. Quantitation of hydroxypridinium crosslinks in collagen by high performance liquid chromatography. Anal Biochem. 1984;137:380.
9. Huo MH, Troiano NW, Pelker RR, Gundberg CM, Friedlaender GE. The influence of ibuprofen on fracture repair: biomechanical, biochemical, histologic, and histomorphometric parameters in rats. J Orthop Res. 1991;9(3):383-90.
10. Aro H, Eerola E, Penttinen R, Aho A. The responses of callus cells and lymphocytes to electrical stimulation in second meeting of european society of biomechanics, Strasbourg. J Biomech. 1979.
11. Li J, Ahmad T, Sepetka M. Bone reinnervation after fracture: A study in the rat. J Bone Miner Res. 2001;18(8):1505-10.
12. Aro H. Effect of nerve injury on fracture healing: Callus formation studied in the rat. Acta Orthop. Scand. 1985;56:223-37.
13. Al-Harby SW, Samy MT, El Naggar MI. Delayed healing of experimental fractures denervated limbs of dogs. Clinical and radiological study. Bahrain Medical Bulletin. 1996;18(1).
14. Aro H, Eerola E, Aho AJ. Healing of experimental fractures in the denervated limbs of the rats. Clin Orthop. 1981;155:211-7.

15. Liu D, Zhao CQ, Li H, Jiang SD, Jiang LS, Dai LY. Effects of spinal cord injury and hindlimb immobilization on sublesional and supralesional bones in young growing rats. *Bone*. 2008;43(1):119-25.
16. Kenwright J, Richardson JB, Cunningham JL, White SH, Goodship AE, Adams MA, Magnussen PA, Newman JH. Axial movement and tibial fractures. A controlled randomised trial of treatment. *J Bone Joint Surg*. 1991;73-B:654-9.
17. Roberts D, Lee W, Cuneo RC, Wittmann J, Ward G, Flatman R, McWhinney B, Hickman PE. Longitudinal study of bone turnover after acute spinal cord injury. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(2):415-22.
18. Obrant KJ, Ivaska KK, Gerdhem P, Alatalo SL, Pettersson K, Väänänen HK. Biochemical markers of bone turnover are influenced by recently sustained fracture. *Bone*. 2005;36(5):786-92.
19. Reiter AL, Volk A, Vollmar J, Fromm B, Gerner HJ. Changes of basic bone turnover parameters in short-term and long-term patients with spinal cord injury. *Eur Spine J*. 2007;16(6):771-6.
20. Watts NB. Clinical utility of biochemical markers of bone remodelling. *Clin Chem*. 1999;45(8):1359-68.
21. Haspolat K, Söker M. Kemiğe ait biokimyasal değerler ve onkoloji. *Dicle Tıp Dergisi*. 2002;29:3.
22. Díaz-Martín MA, Traba ML, De La Piedra C, Guerrero R, Méndez-Dávila C, De La Peña EG. Aminoterminal propeptide of type I collagen and bone alkaline phosphatase in the study of bone metastases associated with prostatic carcinoma. *Scand J Clin Lab Invest*. 1999;59(2):125-32.
23. Mohamadnia AH, Sahahbazkia HR, Sharifi S. Bone-specific alkaline phosphatase as a good indicator of bone formation in sheepdogs. *Comp Clin Pathol*. 2007;16(4):265-70.
24. Lammens J, Liu Z, Aerssens J, Dequeker J, Fabry G. Distraction bone healing versus osteotomy healing: a comparative biochemical analysis. *J Bone Miner Res*. 1998;13(2):279-86.
25. Lammens J, Aerssens J, Nijs J, Mokassa L, Dequeker J, Bouillon R, Fabry G.J. Biochemical and density assessment of the new bone in late remodeling after callus distraction. *J Orthop Res*. 1997;15(3):391-7.
26. Rat bone alkaline phosphatase, BALP ELISA Kit, Catalog No: E1091r
27. Aro HT, Chao EY. Bone healing patterns affected by loading, fracture fragment stability, fracture type and fracture site compression. *Clin Orthop Relat Res*. 1993;293:8-17.
28. Altunatmaz K. Kırık iyileşmesinin biyolojisi ve biyolojik osteosentez. *İst Üniv Vet Fak Derg*. 2001;30(1):141-7.
29. Frost HM. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part II. *Clin Orthop Relat Res*. 1989;248(2):294-309.
30. Aro H, Eerola E, Aho AJ. Determination of callus quantity in 4-week-old fractures of the rat tibia. *J Orthop Res*. 1985;3(1):101-8.

31. Madsen JE, Hukkanen M, Aune AK, Basran I, Møller JF, Polak JM, Nordsletten L. Fracture healing and callus innervation after peripheral nerve resection in rats. Clin Orthop Relat Res. 1998;351:230-40.
32. Topaloglu AK, Yildizdas D, Yilmaz HL, Mungan NO, Yuksel B, Ozer G. Bone calcium changes during diabetic ketoacidosis: a comparison with lactic acidosis due to volume depletion. Bone. 2005;37(1):122-7.
33. Hukkanen M, Konttinen YT, Santavirta S, Nordsletten L, Madsen JE. Effect of sciatic nerve section on neural ingrowth into the rat tibial fracture callus. Clin Orthop Relat Res. 1995;311:247-57.
34. Seebeck P, Bail HJ, Exner C, Schell H, Michel R. Do serological tissue turnover markers represent callus formation during fracture healing? Bone. 2005;37(5):669-77.
35. Gerstenfeld LC, Wronski TJ, Hollinger JO, Einhorn TA. Application of histomorphometric methods to the study of bone repair. J Bone Miner Res. 2005;20(10):1715-22.