T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANA BİLİM DALI

POSTEROLATERAL FÜZYONDA YENİ BİR BİYOMALZEME – KARBON NANOTÜP/ HİDROKSİAPATİT TRİKALSİYUM FOSFAT KOMPOZİTİ: RAT MODELİ

UZMANLIK TEZİ

DR. İSMAİL DALDAL

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ALPASLAN ŞENKÖYLÜ

ANKARA
ARALIK 2016

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANA BİLİM DALI

POSTEROLATERAL FÜZYONDA YENİ BİR BİYOMALZEME – KARBON NANOTÜP/ HİDROKSİAPATİT TRİKALSİYUM FOSFAT KOMPOZİTİ: RAT MODELİ

UZMANLIK TEZİ

DR. İSMAİL DALDAL

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. ALPASLAN ŞENKÖYLÜ

ANKARA

ARALIK 2016

TEŞEKKÜR

Beş yıllık eğitim-öğretim sürecimde beraber çalışma şansına sahip olduğum; bilgi, beceri ve tecrübelerini büyük bir sabır ve özveri ile aktaran, etik ve bilimsel açıdan örnek aldığım başta tez danışmanım Prof. Dr. Alpaslan Şenköylü olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. O. Şahap Atik, Prof. Dr. Selçuk Bölükbaşı, Prof. Dr. Ertuğrul Şener, Prof. Dr. Sacit Turanlı, Prof. Dr. Ulunay Kanatlı, Prof. Dr. Hamza Özer, Prof. Dr. Hakan Selek, Prof. Dr. Akif Muhtar Öztürk, Doç. Dr. Erdinç Esen, Doç. Dr. Ali Turgay Çavuşoğlu, Doç. Dr. Hakan Atalar, Öğr. Gr. Dr. Baybars Ataoğlu' na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlık sürecimin belli bölümünde birlikte çalışma fırsatı bulduğum değerli hocalarım Prof. Dr. Haluk Yetkin, Prof. Dr. Necdet Altun, Prof. Dr. Erdal Cila, Prof. Dr. Sezai Aykın Şimşek' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmam boyunca ayırdıkları vakit ve esirgemedikleri emeklerinden ötürü Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyeleri Prof. Dr. Tuncer Değim ve Dr. Sibel İlbasmış Tamer' e, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji öğretim üyesi Prof. Dr. Suna Ömeroğlu ve ekibine, Hacettepe Üniversitesi Anatomi B.D ekibine ve Hacettepe Üniversitesi Makine Mühendisliği biyomekanik test ekibine teşekkülerimi sunarım.

Eğitimim süresince geceli gündüzlü sürekli birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum başta tüm araştırma görevlisi arkadaşlarım olmak üzere; poliklinik, servis ve ameliyathane çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Bu günlere ulaşmamda emeklerinin karşılığını asla ödeyemeyeceğim anneme ve babama şükranlarımı sunarım.

Uzmanlık eğitimim boyunca bana her zaman destek olan ve zor anlarımda hep yanımda olan değerli eşim Dr. Zeynep Daldal'a , hayatımıza renk katan çocuklarım Zehra Beril ve Mehmet Burak' a teşekkür ederim.

Dr. İsmail Daldal

ANKARA – 2016

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
TABLOLAR iii
ŞEKİLLER iv
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1 Spinal Füzyon 3
2.1.1 Tarihçe 3
2.1.2 Spinal Füzyon Endikasyonları 4
2.1.3 Spinal Füzyon Teknikleri 4
2.1.4 Spinal Füzyon Üzerine Etkisi Olan Faktörler 6
2.2 Kemik Greftleri 8
2.2.1 Greftlerin Genel Özellikleri 8
2.2.2 Greftlerin Konak Üzerindeki Etkileri 11
2.2.3 Greft Tipleri 15
2.3 Karbon Nanotüpler 23
2.3.1 Genel Bilgiler 23
2.3.2 Karbon Nanotüplerin Tıpta Kullanım Alanları 25
2.3.3 Karbon Nanotüplerin Kemik Greftleri İle Birlikte Kullanımı 27
3. GEREÇ VE YÖNTEM 28
3.1 Karbon Nanotüp/Trikalsiyum Fosfat Kompozitin Hazırlanması 29
3.2. Cerrahi Teknik 34
3.3 Manuel Palpasyonla Değerlendirme 38
3.4 Radyolojik Değerlendirme 39
3.5 Biyomekanik Değerlendirme 39
3.6 Mikro Bilgisayarlı Tomografi İncelemeleri ve Değerlendirme 40
3.7 Histolojik Değerlendirme 42
3.8 İstatistiksel Değerlendirme 46
4. BULGULAR 47
5. TARTIŞMA 67
6. SONUÇLAR 79
7. ÖZET (Türkçe ve İngilizce) 81
8. EKLER 85
8.1 Etik Kurul Onayı 85
9. KAYNAKLAR 86

TABLOLAR

Tablo 1. Spinal füzyon oluşumuna etkisi olan lokal ve sistemik faktörler. 8
Tablo 2. Çeşitli greft materyallerinin osteointegratif özellikleri. *(DBM: demineralize kemik matriks, BMP: kemik morfojenik protein, TCP: trikalsiyum fosfat) (0: etkisi yok, +: zayıf etkili, ++: etkili, +++: mükemmel etkili)* 14
Tablo 3. Seramik greftlerin özellikleri. 20
Tablo 4. Çeşitli greft materyallerinin olumlu ve olumsuz yönleri. 22
Tablo 5.ÇDKNT membranlar ve ÇDKNT/TCP kompozitin hazırlanması. 30
Tablo 6. Emery ve arkadaşlarının tanımladığı histolojik puanlama (71) 46
Tablo 7. Manual palpasyon ile elde edilen sonuçlar. (0: belirgin hareket var/ non-solid , 1: bir miktar hareket var , 2: hiç hareket yok/ solid) 48
Tablo 8. Sekizinci haftadaki radyografi bulguları. (bilateral intertransvers proçes ölçümü sonrası 0- 10 puan arası skalaya göre ortalama)..... 48
Tablo 9. Radyolojik değerlerin Kruskal- Vallis analizi ile istatiksel olarak değerlendirilmesi. Tüm gruplar arasında füzyon oranları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,01$). 49
Tablo 10. Mikro- BT incelemeleri sonrası Kemik Volüm (BV) / Doku Volüm (TV) değerlerinin sağ ve sol intertransversal füzyon alanı olarak değerleri. 55
Tablo 11. Mikro- CT görüntülemeleri ile füzyon kitlesi kemik volümü/ doku volümü (BV/TV) oranlarının Kruskal- Vallis analizi ile istatiksel olarak değerlendirilmesi. Tüm gruplar arasında füzyon oranları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,01$). 56
Tablo 12. Deneklerin histolojik değerlendirme ile elde edilen puanları. 61
Tablo 13. Füzyon kitlesi histolojik verilerinin Kruskal- Vallis analizi ile istatiksel olarak değerlendirilmesi. Tüm gruplar arasında füzyon oranları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,01$). 61

ŞEKİLLER

Şekil 1. Bir uzun kemik örneğinde kemiğin genel olarak yapılarının incelenmesi. 10
Şekil 2. a) İşlenmemiş ticari KNT formu. b) Karbon formları olan Grafen, fullaren, grafit ve KNT nin şematik gösterimi. 24
Şekil 3. Çeşitli ÇDKNT formları. 25
Şekil 4. Hazırlanan ÇDKNT membranlar (alt sıra) ve ÇDKNT/ HA-TCP kompozitler (üst sıra)..... 31
Şekil 5. ÇDKNT membranın, (üst resim) 10 mikronluk alanda, (alt resim) 1 mikronluk alandaki SEM görüntüleri. 32
Şekil 6. (a,b) ÇDKNT/HA-TCP kompozitin, a) 10 mikronluk alanda, b) 1 mikronluk alandaki SEM görüntüleri. 33
Şekil 7. a,b) HA-TCP' nin 50 mikronluk ve 10 mikronluk alandaki SEM görüntüleri. 33
Şekil 8. a,b) Deneklerin cerrahiye hazırlanması. 34
Şekil 9. L2- L5 arası orta hat longitudinal insizyonu ile cilt, cilt altı dokuların geçilmesi ve Wiltse yaklaşımı ile bilateral paravertebral kas planları arasından posterior kemik arka ulaşılması. 35
Şekil 10. a) Hayvanların L4-L5 seviyesinde posterior ark ve transvers çıkıntıların elektrikli burr cihazı ve küçük rounger yardımı ile dekortikasyonu sonrası 2X5 mm lik hazırlanan ÇDKNT ve ÇDKNT/HA-TCP materyallerinin intervertebral yatağa uygulanması. b) KNT membran parçası. c) ÇDKNT/ TCP-HA parçası. .. 36
Şekil 11. a,b) Postoperatif tüm cerrahi katların kapatılması ve birinci hafta yara yeri görüntüsü. 37
Şekil 12. Sakrifikasyon sonrası çıkarılan lumbosakral segment. Füzyon alanına zarar vermemek için büyük segment olarak çıkarılmıştır, sonrasında ise keskin bistüri ile L2-L3 diski ile L6-S1 diski arasındaki segment kalacak şekilde dış ortamda küçültülmüştür. 38
Şekil 13. Üç nokta eğilme testinin yapıldığı cihazın görüntüsü. (Servo U-Test) 40
Şekil 14. Grup 4 den 2 deneğin 8. hafta sonrası x-ray görüntüleri. 50
Şekil 15. Grup 3 den 2 deneğin 8. hafta sonrası x-ray görüntüleri. 51
Şekil 16. Grup 2 den 2 deneğin 8. hafta sonrası x-ray görüntüleri. 52
Şekil 17. Grup 1 deki (Dekortikasyon) 2 deneğin 3 nokta eğilme testi grafileri. 53
Şekil 18. Grup 2 deki (KNT) 2 deneğin 3 nokta eğilme testi grafisi. 54
Şekil 19. Grup 3 deki (HA-TCP) 2 deneğin 3 nokta eğilme testi grafisi. 54
Şekil 20. Grup 4 deki (KNT/HA-TCP) 2 deneğin 3 nokta eğilme testi grafisi. .. 55
Şekil 21. Grup 4' deki (KNT/HA-TCP) bir deneğin füzyon alanının 3 boyutlu mikro-BT görüntüsü. 57
Şekil 22. Grup 4' deki (KNT/HA-TCP) bir deneğin füzyon alanının 3 boyutlu mikro-BT görüntüsü. 57
Şekil 23. Grup 4' den (KNT/HA-TCP) başka bir örnek. 58
Şekil 24. Grup 3' den (HA-TCP) bir örnek. 58
Şekil 25. Grup 3' den (HA-TCP) bir örnek. 59

Şekil 26. Grup 2' den (KNT) bir örnek. 59
Şekil 27. Grup 2' den (KNT) bir örnek. 60
Şekil 28. A,B. Sadece dekortikasyon yapılan gruba ait rat dokusunda, birbirleriyle anastomozlaşan, aralarında kemik iliğinin (★) bulunduğu kemik trabekülleri (⩓) izlenmekte, ancak kemik dokusu (host bone (🡄) dışında yeni bir dokunun oluşmadığı dikkati çekmektedir. (A: Hematoksilen-eozin x100, B: Masson Trikrom x100) 62
Şekil 29. A,B.: KNT yerleştirilmiş gruba ait rat dokusunda, KNT biomateryali (KNT) ile füzon alanında, kemik dokusu (host bone) (🡄) arasında, yoğun, fibröz bağ dokusu (◀), prolifere bağ dokusu ile kemik dokusu arasındaki demarkasyon hattı (←) gözlenmekte. (A: Hematoksilen-eozin x100, B: Masson Trikrom x100) 63
Şekil 30. A,B) HA-TCP materyali çevresinde ve füzyon alanındaki prolifere bağ dokusu, kondrositleri (ch) içeren kondroid özellikteki, yeni organize olmaya başlamış trabeküler özellikte kemik dokusu ve prolifere bağ dokusu ile kemik dokusu arasındaki demarkasyon hattı (←) (A: Hematoksilen-eozin x400, B: Masson Trikrom x400) 64
Şekil 31. A,B) Cnt+Tcp materyali (KNT/HA-TCP) çevresinde kıkırdak dokusu (♦) , kondrositler (ch) ve trabeküler özellikteki kemik dokusu (▬) varlığı dikkati çekti. (A: Hematoksilen-eozin x400, B: Masson Trikrom x400) 65
Şekil 32. Sadece dekortikasyon (A), KNT (B), HA-TCP (C) ve KNT/HA-TCP grubuna (D) ait kesitlerde osteopontin immunreaktivitesi. Kemik dokuda, osteositlerde (os), kemik iliği hücrelerinde, proliferatif bağ dokudaki fibroblastlarda (sarı ok); biomateryalde (HA-TCP) ve kondrositlerde (kırmızı ok) yeni kemik dokusu oluşumu içinde osteopontin immün reaktivitesi izlendi. (DAB -Hematoksilen x400) 66
Şekil 33. Hayvan deneyleri yerel etik kurul onay belgesi. 85

1. GİRİŞ

1911 yılında Hibbs ve Albee tarafından eş zamanlı ve birbirlerinden bağımsız olarak spinal tüberkülozlu hastalarda bilinen ilk posterior spinal füzyon gerçekleştirilmiştir (**1,2**). Spinal füzyon iki veya daha fazla vertebra segmentinin biyolojik ve/veya mekanik yöntemlerle hareketsiz hale getirilmesi olup ilgili spinal segmentlerde stabiliteyi sağlamak ve sürdürmek için kullanılan cerrahi işleme verilen isimdir.

Spinal füzyon oluşturmada mekanik ve biyolojik faktörlere ihtiyaç vardır. Mekanik faktörler cerrahi tespitte kullanılan rodlar, vidalar, kancalar, teller, plak ve dıştan tespit araçları gibi materyaller iken, biyolojik faktörler ise füzyon istenilen segment içindeki faset eklem eksizyonu, dekortikasyon, kemik greftlemesi ve immobilizasyondur. Günümüzde spinal füzyon oluşumu için sadece mekanik faktörlerin yeterli olmadığı, etkin bir mekanik fiksasyon sonrası başarılı bir füzyon kitlesinin oluşabilmesi için biyolojik faktörlerin de devreye girmesi gerektiği bilinmektedir (**3,4**).

Kemik greftlemesi spinal füzyon oluşturmada vazgeçilmez olan biyolojik faktörlerden biridir. Greftleme olmaksızın sadece dekortikasyon ve faset eklem eksizyonun biyolojik füzyon oluşumunda yetersiz kaldığı, sonuçta psödoartroz ve implant yetersizliğinin kaçınılmaz olduğu bilinmektedir. Psödoartroz spinal füzyon operasyonları sonrasındaki başarısız sonuçların en önemli nedenidir ve literatürde psödoartroz oranları %5 ile %40 oranında değişmektedir (**3,5,6**).

Kemik grefti olarak otogreft, allogreft, zenogreft ve sentetik kemik greftleri kullanılmaktadır. Otojen kemik greftleri osteojenik, osteokondüktif ve osteoindüktif özellikleri ile en güvenilir ve en etkili greft materyalidir. Buna rağmen artmış operasyon süresi ve kan kaybı, greft alınan sahaya bağlı morbiditeler ile alınabilecek otojen greft miktarının sınırlı kalması belli dezavantajlarıdır (**7,8**).

Günümüzde ideal greft materyali olan otojen grefte en yakın etki ve güvenilirliğe sahip olabilecek greft materyalleri geliştirilmesi için büyük çaba harcanmaktadır. Karbon nanotüp (KNT) içerikli biyokompozitlerin teorik olarak mükemmel biyolojk ve mekanik özellikleri çeşitli deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. Spinal füzyon prosedürlerinde çok çeşitli greft materyallerinin kullanıldığı çalışmalar olsa da KNT içerikli biyokompozit greftlerin etkileri ile ilgili henüz bir çalışma yoktur.

Bu çalışmada in-vitro ortamda KNT ve trikalsiyum fosfat (TCP) içerikli bir biyokompozit oluşturulmuş ve rat modelinde posterolateral füzyon oluşturmadaki etkinliği değerlendirilmiştir. Beşerli dört grup oluşturulmuş (grup 1 -TCP, grup 2- KNT , grup 3 - sadece dekortikasyon, grup 4 KNT/ HA-TCP) ve bu gruplardaki spinal füzyon karşılaştırılmıştır. Elde edilen spinal segmentlerdeki füzyon durumu manuel, radyografik, mikro bilgisayarlı tomografi (micro-CT), biyomekanik ve histomorfometrik olarak değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Spinal Füzyon

2.1.1 Tarihçe

1911 yılında Hibbs ve Albee eş zamanlı ve birbirlerinden bağımsız olarak omurga tüberkülozlu hastalarda posterior spinal füzyonu gerçekleştirmişlerdir. Albee otolog tibia greftini, Hibbs ise yine otolog olarak spinöz çıkıntılardan elde ettiği greftleri kullanarak başarılı spinal füzyonu gerçekleştirmişlerdir (**2**). Greft uygulamalarının tarihi ise spinal füzyon prosedürlerinden daha eskiye dayanır. Tarihte bilinen ilk greft uygulaması 1668 yılında Hollanda' lı bir cerrah olan Jon Vob Meekeren tarafından bir askerin kafatasındaki defektin köpek kafatasından aldığı zenogreft ile onarılması olarak bildirilmiştir (**1**). Sonrasında 1881 yılında William Macewen humerusa tibial düzeltici osteomilerden elde ettiği allogreftlerle rekonstrüksiyon uygulayarak klinik anlamda greftlemeyi tutarlı ve yol gösterici şekilde açıklamıştır (**2,9**).

İlk dönemlerde spinal füzyon enfeksiyon (Pott hastalığı) başta olmak üzere skolyoz ve kırık vakalarında uygulanmıştır. Bu uygulamalarda füzyon herhangi bir enstrümantasyon uygulanmadan gerçekleştirilmiştir. Sonrasında enstrümantasyon uygulanmadan gerçekleştirilen füzyon uygulamalarında düşük füzyon oranları gözlenmiş, mekanik fiksasyonla immobilizasyonun önemi anlaşılmıştır. 1902' de Lange çelik rodlarla birlikte kancalar kullanmaya başlamıştır. Sonrasında Raymond Roy Camille tarafından geliştirilen daha stabil

bir sistem olan pedikül vidaları kullanılmaya başlanmıştır. 1960 larda ise Harrington skolyoz cerrahisinde kullanılan kompresyon distraksiyon çubuklarını geliştirmiş ve vertebra cerrahisine çok yönlü bir boyut kazandırmıştır. Sonrasında Luque tel ve rodların kombinasyonundan oluşan spinal sistemleri geliştirmiş, ancak 1980 li yılların başında bu birinci ve ikinci kuşak enstrumantasyon sistemlerinin yetersizliği anlaşılmıştır. Son olarak Magerl, Krag, Edward, Zielke, Cotrel-Debousset' in katkıları ile günümüzde kullanılmakta olan 3 boyutlu düzlemde düzeltmeye olanak sağlayan pedikül vidası, kanca ve rod sistemlerinden oluşan 3. kuşak enstrümantasyon sistemleri geliştirilmiştir (**10-11**).

2.1.2 Spinal Füzyon Endikasyonları

Spinal füzyon günümüzde travma, deformite, enfeksiyon, tümör, dejeneratif omurga hastalıkları ve postoperatif omurga instabilitesi gibi aslında omurgayı ilgilendiren hemen hemen bütün cerrahi girişimlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (**12,13,14**). Spinal füzyon ile amaçlanan stabilite, omurganın fizyolojik yüklenmeler altında dizilimini ağrısız olarak sürdürme ve nöral sistem başta olmak üzere yumuşak dokulara zarar vermeme yetisi olarak tanımlanabilir (**15**).

2.1.3 Spinal Füzyon Teknikleri

Spinal füzyon için tariflenmiş posterior, anterior veya hem anteriyor hem de posterior yaklaşımın kullanıldığı füzyon teknikleri mevcuttur. Genel olarak

spinal füzyon teknikleri için faset füzyonu, posterolateral füzyon, posterior lomber vertebralar arası füzyon (PLİF), anteriyor lomber vertebralar arası füzyon (AİF), kombine füzyon teknikleri ve tarihsel önemi olan posterior orta hat füzyonu belirtilebilir (**16,17,18**).

Posterior Orta Hat Füzyonu: Hibbs ve Albee tarafından tanımlanmış ilk füzyon tekniği olması bakımından tarihsel öneme sahiptir. Bu dönemde füzyon tekniği enstrümantasyonsuz olarak uygulanmıştır. Aynı zamanda bu bölgedeki füzyon kitlesinin spinal stenoza yol açması ve bu bölgenin vaskülaritesinin az olması nedeni ile tercih edilmemektedir.

Faset Füzyonu: Faset eklem yüzlerinin rezeksiyonu ile eklem kıkırdağı uzaklaştırılır ve eklem çevresi dekortikasyon uygulanır.

Posterolateral Füzyon: Günümüzde en yaygın olarak kullanılan füzyon tekniklerinden biridir. Posterior orta hat defektlerinde uygulanabilir olması, tekniği uygulama kolaylığı, bölgenin kanlanmasının iyi oluşu ve dolayısıyla yüksek spinal füzyon oranlarının bulunması nedeniyle çok avantajlıdır (**16,17,19**).

Posterior Lomber Vertebralar Arası Füzyon (PLIF): Bu teknikte disk materyali çıkarılarak vertebra cisimleri arasındaki boşluğa greft yerleştirilir. Temas alanının çok geniş olması, greft materyalinin komprese olması, füzyon merkezinin vertebral hareket merkezine yakın olması, kanlanmanın iyi olması avantajlarıdır. Ancak bu prosedürün en büyük dezavantajı nöral yapıların risk altında olmasıdır(**20**).

Anterior Lomber Vertebralar Arası Füzyon (AİF): Tümör eksizyonu, debridman, kırık sonrası dekompresyon, dejeneratif spondilolistezis tedavilerinde

AİF uygulanabilir. Problemli bölgeye direk yaklaşım imkanı olmasına rağmen cerrahi sırasındaki hayati dokuların hasarlanma riski en büyük dezavantajıdır.

Kombine Füzyon Teknikleri: İatrojenik düz bel sendromu, ileri derecedeki spondilolistezis, kompleks tümör olguları gibi durumlarda füzyon oranlarını arttırmak için kombine yaklaşım tercih edilebilir. Literatürde kombine yaklaşım füzyon oranı en yüksek bulunan yaklaşımdır. Özellikle AİF uygulanan hastalarda anteriyordan yapılan stabilizasyonun zayıf olması nedeniyle füzyon oranlarını arttırabilmek için ek olarak posterior yaklaşım kombine edilebilir.

Genel olarak etkili bir füzyon sağlayabilmek için greft materyalini kompresif güçler altında tutmak, vaskülaritenin iyi olduğu bölgede greftleme yapmak, greftleme sonrasında greft sahasındaki hareketi engellemek, greftlemeyi mümkün olduğunca vertebra rotasyon merkezinin yakınına uygulamak füzyonun başarısını artırır.

2.1.4 Spinal Füzyon Üzerine Etkisi Olan Faktörler

Spinal füzyon oluşum sürecinde seçilecek greft materyali ve miktarı kadar sistemik ve lokal faktörlerin de etkisi vardır. Lokal faktörlerden kasıt greft sahası hazırlığı, dekortikasyon, füzyon yatağının vaskülaritesi, füzyon segmentindeki immobilizasyon, fizyolojik mekanik yüklenme olarak sayılabilir. Ayrıca klinik pratikte çok kullanım alanı bulmamasına rağmen elektirik stimülasyon ve düşük dalga boyutlu ultrasonun da füzyon kitlesine pozitif lokal etkileri vardır (**21**). Zideblick ve Gurr' un yaptıkları çalışmalarda rijit fiksasyonlu, semirijit fiksasyonlu ve fiksasyon olmadan yapılan deneysel posterolateral füzyon

çalışmalarında mekanik stabilite ile füzyon arasında doğrusal bir ilişki bulunmuştur(**22,23**). Dekortikasyon işlemi füzyon uygulanacak bölgede vaskülaritesi ve osteojenik potansiyeli yüksek olan spongiyoz kemiğin açığa çıkarılması bakımından çok önemlidir. Çeşitli ortopedik cerrahi el aletlerinin (ronger, küret, osteotom… gibi) yanında düşük hızlı motorize bir burr ile de dekortikasyon işlemi başarıyla yapılabilmektedir. Füzyon yatağı hazırlanırken travmatize edilmemeli, avasküler yapılar temizlenerek sahadan uzaklaştırılmalıdır. Füzyon yatağı vaskülaritesi endokrin stimuluslar, osteopregenitör hücreler ve inflamatuar yanıt için temel taşıyıcıdır.

Beslenme yetersizliği, hematolojik hastalıklar, steroid olmayan antienflamatuar (NSAİİ) kullanımı, sigara kullanımı gibi sistemik durumlar spinal füzyona olumsuz etkilidirler. Toplumda özellikle yaşlı popülayonda sık görülen osteoporozda da osteogenezis için gerekli olan osteoprogenitör hücre azalmasından dolayı füzyon oluşumu olumsuz yönde etkilenir. Yine steoidler kemik rezorpsiyonunu artırıcı etki yaparak füzyon oluşumunu azaltırlar. Füzyonu etkileyen sistemik ve lokal faktörler **Tablo 1'** de verilmiştir.

Lokal Faktörler		Sistemik Faktörler	
Olumlu	**Olumsuz**	**Olumlu**	**Olumsuz**
-Stabilite	- Radyasyon	-Büyüme hormonu	-Sigara
-Dekortikasyon	- Tümör	-İnsülin	- Steroidler
-Vaskülarite	- İnstabilite	-Troid hormonu	- Osteoporoz
-Mekanik yükler	- Enfeksiyon	-Vitamin A, D	- Anemi
-Büyüme faktörleri	-Yetersiz greft	-Kalsitonin	- Diyabet
		-PTH	-Orak hücreli anemi
			- NSAİİ
			- Kemoterapotikler
			- Vit. D eksikliği

Tablo 1. Spinal füzyon oluşumuna etkisi olan lokal ve sistemik faktörler.

2.2 Kemik Greftleri

2.2.1 Greftlerin Genel Özellikleri

1658 yılında Hollanda'lı cerrah J.V Meekeren tarafından bir askerin kafatasındaki defekti köpek kafatasından aldığı bir kemik parça ile tedavi ederek tarihteki ilk greftlemeyi gerçekleştirmiştir (**24**). Bu uygulama bir zenogreft olup sonrasında 1881 yılında Macewen tarafından ilk başarılı allogreft uygulaması yapılarak klinik uygulamalar için önemli bir adım daha atılmıştır (**25**). Günümüzde ise kemik greftlemesi ortopedik cerrahi ve maksillofasial cerrahinin

vazgeçilmezlerindendir ve ideal grefte ulaşmak için çok çeşitli greft seçenekleri çalışılmaktadır.

Ortopedik cerrahide genel olarak kemik greftleri kırık sonrası kaynamama, kaynama gecikmesi veya yetersizliği gibi durumlarda, artrodez oluşturmada, kist, tümör gibi nedenlerle kemikte oluşan boşlukları doldurmada, psödoartroz durumlarında, uzun kemiklerin büyük defektlerle sonuçlanan kırıklarında köprü vazifesi görerek devamlılığı sağlamada kullanılırlar.

Kemik greftleri değişik kaynaklardan elde edilebilir. Elde edildikleri kaynaklara göre kemik greftleri terminolojisine bakarsak:

Otogreft : greft materyali kişinin kendisinden elde edilir.

Synogreft (izogreft) : tek yumurta ikizlerinden birinden alınan kemik diğerinde kullanılmak üzere elde edilir.

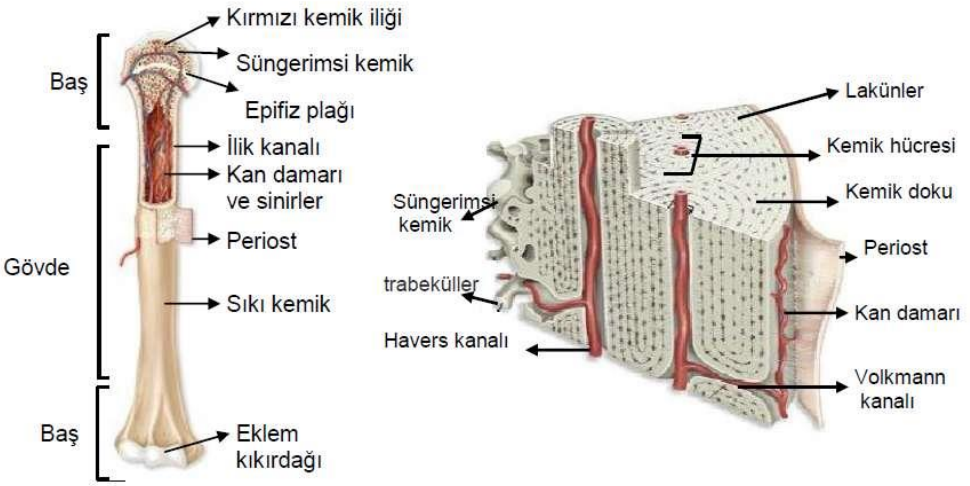
Allogreft : aynı tür içinde farklı bir bireyden elde edilen grefttir.

Zenogreft : greft materyali farklı bir türden elde edilir.

Sentetik greft : laboratuvar ortamında elde edilen grefttir.

Greftlerin yapısını anlayabilmemiz için öncelikle kemiğin yapısını ve özelliklerini bilmemiz gerekir. Yapısal olarak spongiyoz ve kompakt kemik olarak iki farklı yapıda kemik bulunur. Kompakt kemik kemiğin uzun aksına paralel uzanmış yoğun haversiyan sistemlerinden oluşur. Spongiyoz kemik ise trabeküler yapıda olup kimik iliği alanları içerir. Osteositler, osteoblastlar ve osteoklastlar kemik dokusunun üç temel hücresidir. Osteositler matür hücreler olup lakuna adı verilen boşluklarda bulunurlar. Osteoblastlar uygun ortam ve stimuluslarla aktif hale geçen kemik yapıcı hücrelerdir. Osteoklastlar ise aktivasyonları çevresel,

hormonal ve kimyasal etkilere bağlı olan kemiğin rezorbsiyonundan sorumlu hücreleridir. **(Şekil 1)**



Şekil 1. Bir uzun kemik örneğinde kemiğin genel olarak yapılarının incelenmesi.

Spinal füzyon için kullanılan greft materyalleri genel olarak fiziksel yapılarına göre ve elde edildikleri kaynaklara göre isimlendirilirler. Fiziksel yapılarına göre kalsellöz greftler, kortikal greftler ve kortikokansellöz greftler olarak sınıflandırılırlar. Kansellöz kemik yapısal destek bakımından zayıftır ancak hızlı inkorpere olur ve farklı şekillerdeki boşlukları doldurmada kolaylık sağlar. Kortikal kemik ise özellikle mekanik destek istenilen durumlarda tercih sebebidir. Her iki kemik formunun avantajlarından faydalanılmak isteniyorsa kortikokansellöz formda greftler tercih edilir.

Kemik grefti tipi ne olursa olsun alıcıya uygulanması sonrasında alıcının biyolojik yapısı ile uyuşarak füzyon oluşturabilir, kısmen veya tamamen rezorbe edilebilir, ya da alıcı tarafından yabancı cisim gibi algılanarak sekestre olur ve reaksiyon oluşturur.

2.2.2 Greftlerin Konak Üzerindeki Etkileri

İdeal bir kemik grefti alıcı tarafından kabul edildikten sonra greftin inkorporasyonu sürecinde a) osteogenezis, b) osteoindüksiyon, c) osteokondüksiyon olmak üzere üç fonksiyonu yerine getirir.

2.2.2.1 Osteogenezis : Bu süreçte greftteki osteoprogenitör kök hücreler ve bunların tetiklediği osteoblastik aktivite vasıtasıyla yeni kemik oluşumu gözlenir. Yani greft materyali alıcıda canlı hücreler vasıtasıyla yeni kemik oluşumuna yol açar. Osteogenezise en iyi örnek otolog kemik iliği hücreleri ve otojen taze greftlerdir. Otojen greftlerde matür osteositler nekroz ve apoptoz yolu ile canlılığını kaybetmesine rağmen, osteopregenitör hücreler (preosteoblast ve preosteoklastlar) canlı kalarak osteojenik aktivitede rol alırlar (**8,26**).

2.2.2.2 Osteoindüksiyon : Osteoindüksiyon terimi 1960 'lı yıllarda Urist tarafından bone morfogenetik protein (BMP) ve demineralize kemik matriksi (DBM) ile yapılan çalışmalar sonucunda tanımlanmıştır (**27**). Farklılaşmamış mezenkimal hücrelerde osteoblastlara farklılaşabilme yeteneğinin olması osteoindüktif özelliği belirtir. Osteoindüktif özelliği olan greftler farklılaşmamış

dokuyu kemik oluşum yönünde diferansiye eden faktörleri sağlayarak etki ederler. Kırık sonrası gelişen kırık hematomu sonrasında osteoklastik rezorbsiyon ve yeni kemik oluşumu sürecinde açığa çıkan BMP, transforming growth faktör- beta (TGF-beta), osteogenin iyi tanımlanmış osteoindüktif faktörlerdir (**8,9,28**).

2.2.2.3 Osteokondüksiyon: Bir greftin alıcıda üç boyutlu bir yapı iskeleti oluşturarak çevresinde ve alıcıda yeni kemik oluşumunu arttırması ve alıcıda içe büyümeyi (ingrowth) uyararak kemik oluşumu için uygun ortamı hazırlayan materyallerin özelliğidir. Osteokondüktif özelliği iyi olan greftler alıcı kemik bölgesinde iyi bir biyomekanik destek sağlar ve yeni kemik oluşum sürecinde mekanik stabililitesi azalarak yeni oluşan kemiğe aktarılır (**8,9**). İdeal osteokondüktif özelliği bulunan greftler alıcıda optimum biyomekanik desteği sağlarken aynı zamanda yeni kemik oluşum sürecindeki damarlanma (neovaskülarizasyon) ve osteoblastik hücre öncüllerinin infiltrasyonu için uygun porozitede ve geçirgenlikte olmalıdır.

Son yıllarda osteopromosyon terimi bazı maddeler için kullanılmaktadır. Osteopromotik ajanlar de-novo kemik oluşumuna yardımcı olurlar. Bu maddeler belirgin osteojenik, osteoindüktif veya osteokondüktif özellikte olmamalarına rağmen solid füzyon oranlarını artırabilirler (**29**). Trombosit jelleri, trombositleri ve büyüme faktörlerini içerir ve füzyonu artırmak için allogreft veya otogreft kemik ile kombine edilebilir. Bu jeller intraoperatif olarak hastanın kendi kanından üretilmekte ve trombositten yoksun plazma ve kırmızı kan hücrelerinin

çıkarılması amacıyla işlenmektedir. Sonrasında hastaya uygulanırken tampon kat jel üretmek için trombin ve kalsiyum klorür ile birleştirilir. Sıçan ve koyun modelleri kullanan bazı klinik öncesi çalışmalarda, trombosit jelinin otogreft ile kombine edildiğinde füzyon hızlarında bir artışa yol açtığı ve ayrıca hidroksiapatit ile birlikte kullanıldığında ise osteoindüktif potansiyelde artışa neden olduğu bildirilmiştir (**30-31**). Ancak , daha sonraki klinik çalışmalar trombosit jellerinin kullanılmasını desteklememektedir.

Trombosit jelleri gibi plazma transglutaminazlar, fibrin-binding protein gibi çeşitli osteopromotik ajanlar de-novo kemik oluşumuna yardımcı olabilir. Hayvan çalışmaları, platelet jel kullanıldığında artmış füzyon oranlarını göstermiştir; Bununla birlikte, bu ek madde, insan çalışmalarında benzer sonuçlar vermemiştir.

Spinal füzyonda genel olarak birden fazla kombine şekilde greft materyali kullanılmaktadır. **Tablo 2'** de çeşitli greft materyallerinin konak üzerindeki osteointegratif özellikleri özetlenmiştir.

Greft Tipi	Osteoindüksiyon	Osteokondüksiyon	Osteogenezis
Otojen greft	++	++	++
Allogreft	+	++	0
Ksenogreft	0	++	0
Beta - TCP	0	++	0
Hidroksiapatit	0	+	0
Kalsiyum Sülfat	0	+	0
Kemik İliği Aspiratı	++	0	++
DBM	++	+	0
BMP	+++	0	0

Tablo 2. Çeşitli greft materyallerinin osteointegratif özellikleri. *(DBM: demineralize kemik matriks, BMP: kemik morfojenik protein, TCP: trikalsiyum fosfat) (0: etkisi yok, +: zayıf etkili, ++: etkili, +++: mükemmel etkili)*

İnkorporasyon greftin tipi ve kaynağı ne olursa olsun, greft ile alıcı kemik arasındaki birleşmeyi ifade eder. İnkorporasyon süreci ***enflamasyon, vaskülarizasyon, osteoindüksiyon, osteokondüksiyon ve remodelizasyon*** olmak üzere toplam 5 evrede gerçekleşir. Greft uygulaması sonrası ilk olarak yoğun bir enflamatuar yanıt ilk saatlerde başlar ve 36-72 saat sonra greft içine doğru yeni kapiller damar gelişimi olur. Allogreftlere karşı gelişen enflamasyon otogreftlere oranla daha şiddetli olup inkorporasyon süresi allogreftlerde uzar. Bu durum allogreftlerde oluşan immün yanıtın daha çok enflamasyona neden olması

nedenlidir. Neovaskülarizasyon sonrası nekrotik kemik materyali uzaklaştırılmaya başlar ve yerini çevre dokulardan gelen farklılaşmamış mezenkimal hücreler alarak osteoblastlara dönüşür. Eğer greftin osteojenik özelliği mevcut ise doğrudan kemik oluşumu da katkı da bulunur. Yeni oluşmaya başlayan kemik hücreleri grefti bir iskele olarak kullanarak ilerler (osteokondüksiyon). Bu süreç yeni kemik oluşumu arttıkça greftinde rezorbsiyonunda artma ile sonuçlanır ve nihayet greft materyalinin yerini tamamen yeni oluşan kemik dokusu almıştır. Oluşan yeni kemik alıcı kemik tarabeküler sistemi ile bağlantılıdır ve süreç artık remodelasyonla uzun süre devam eder. Süngerimsi kemikte süreç 6-12 aya kadar sürerken kortikal kemikte ise 12-24 aya kadar uzar (**32,33,34**).

2.2.3 Greft Tipleri

2.2.3.1 Otogreftler : Taze Otojen greftler osteointegratif özelliklerin (osteogenezis, osteoindüksiyon, osteokondüksiyon) tümüne sahip olan ve diğer greft tipleri ile karşılaştırıldığında en ideal olan greft tipidir. Kortikal otogreftlerin biyomekanik olarak kansellöz kemikten üstün olması dışında bir avantajı yoktur. Kansellöz otogreftler ise trabeküler yapısı nedeniyle inkorporasyon açısından birim hacimde daha geniş yüzey alanına sahiptir. Bu özellik alıcı kemik ile greft yer değiştirme süresi daha kısa olmasına ve neovaskülarizasyonun daha kolay gerçekleşmesine olanak sağlar (**8,9,33**). Otogreftlerin diğer bir avantajı da greft reddi ve hastalık taşınma riskinin söz konusu olmamasıdır.

Otojen greftlerin ideal greft özelliklerine sahip olmasının yanında bazı dezavantajları ve komplikasyonları bildirilmiştir. Bu olumsuzluklar donör saha morbiditelerini, cerrahi sürenin uzamasını ve greft gereksiniminin fazla olacağı uzun segment spinal füzyon gibi cerrahilerde yetersiz greft miktarını kapsar. İliak kanattan otogreft elde edilirken nadir de olsa nörovasküler yaralanmalar (lateral femoral kutanöz sinir, kluneal sinirler, süperiyor gluteal damar yaralanması gibi) gelişebilir (**35**). Yine düşük oranda omurga füzyonu sonrası iliak kemikten alınan greft nedenli kırık gelişen küçük seriler bildirilmiştir. Bu kırıkların özellikle uzun süreli ilaç kullanan ileri yaş kadın hastalarda görüldüğü bildirilmiş ve bu iyatrojenik kırık riskini en aza indirmek için cerrahi sırasında dikkatli olunması ve aşırı miktarda greftin alınmaya çalışılmaması önerilmiştir. Yine kadavra çalışmaları öncülüğünde iliak greft temininde spina iliaka anterior süperior (SİAS) un en az 3 cm posteriorundan işlemin yapılması önerilmiştir. Ayrıca donör sahasında görülen ağrı postoperatif erken dönemde en sık görülen olumsuzluktur ve yaklaşık dörtte birinde kronik ağrı gelişebileceğini gösteren çalışmalar bildirilmiştir (**35,36,37**). Greft alınan ilyak sahada görülen kronik ağrının temel sebebi cerrahi sırasında sakroilyak eklemin hasarlanmasıdır.

2.2.3.2 Allogreftler : Allogreft uygulamaları 1950 li yıllarda geliştirilen kemik bankalama yöntemleri ile artış göstermiştir. Spinal cerrahide allogreftlerin asıl kullanım alanı spinal deformiteler ve dejeneratif hastalıklarda füzyon oluşturmak amaçlı olup genellikle diğer greft tipleri ile kombine edilirler.

Allogreftler yüksek osteokondüktif, zayıf osteoindüktif etkiye sahiptir ancak osteojenik özellikleri yoktur. İnkorporasyon süreçleri otojen greftlere göre daha uzundur ve spinal füzyon oluşturmada otogreftler kadar başarılı değildirler. Alıcıda immun reaksiyon oluşturma riski ve HIV, hepatit B, hepatit C gibi virüsler yolu ile hastalık taşıma riski dezavantajlarıdır (**38,39**).

Taze allojen kemik greftleri alıcıda immun cevap oluşturmalı nedeni ile kullanılmazlar. Günümüzde allogreftlerin hazırlanması ve saklanması için dondurma (freezing) ve dondurup- kurutma (freeze- drying) işlemleri uygulanabilir. Kadavradan uygun kemik 24 saat içinde alınmalı ve etilen oksit veya gama irradyasyon ile sterilize edilmelidir. Sonrasında – 70 derecede dondurma işlemi gerçekleştirilir. Dondurma veya dondurup kurutma işlemleri allogreftin immünojenitesini belirgin olarak azaltır ve sterilitenin devamını sağlar. Dondurup kurutma işlemi sadece dondurma işlemine göre immünojeniteyi daha da azaltmaktadır. Bunu nedeni derin dondurma işleminde matriks proteinlerinin korunması, aksine dondurulup kurutma işleminde ise bu proteinlerin parçalanmasıdır. Dondurup kurutma tekniğiyle hazırlanan allogreftlerle herhangi bir hastalık geçtiğine yönelik çalışma bildirilmemiştir. Genel olarak sadece dondurma işlemi sonrası greftin mekanik gücünde belirgin kayıp olmazken, dondurulup kurutulan teknikte greftin tensil ve torsiyonel kuvvetlerinde azalma olduğu, kompresif kuvvetinde ise değişme olmadığı bildirilmiştir (**40**).

Allogreftler spinal füzyon cerrahisinde sıklıkla greft genişletici olarak kullanılmaktadır. Allogreftler kolayca elde edilebilmesine rağmen lomber omurgada füzyon için allogreftin etkinliği ile ilgili endişeler mevcuttur. Gibson ve

arkadaşlarının yaptığı, prospektif randomize bir çalışmada, enstrümante edilmiş postero-lateral lomber füzyonda taze dondurulmuş allogreft ile ilyak kanat otogreft uygulanan 69 hastada benzer klinik sonuçlar bildirilmiştir (**41**). Samartzis ve arkadaşlarının yaptığı çok seviyeli anterior servikal korpektomi ve füzyonda, allogreft otogreft ile karşılaştırıldığında, sırasıyla allogreft ve otogreft için % 94.3 ve % 100 füzyon oranları bildirmiştir (**42**). Yazarlar, başarılı sonuç için titiz cerrahi teknik ve hasta seçiminin greft tipinden daha önemli olduğunu düşünmüşlerdir. Etkinlik sorununun ötesinde, hastalık iletiminin potansiyel riski allogreft kemiğinin kullanımı ile ilgili en büyük endişelerden biridir. Allogreft dokusu ile ilgili FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) verilerinin retrospektif bir derlemesinde, 1994- 2007 yılları arasında 59.476 kas-iskelet sistemi allogreft doku örneğinin geri çağrıldığını, geri çağırmanın başlıca nedenleri arasında hatalı verici değerlendirme, bulaşma ve alıcı enfeksiyonları olduğu bildirilmiştir (**43**). Bu endişelere rağmen, allogreft kullanılan omurga füzyon vakalarında herhangi bir bakteriyal hastalığın bulaştığı bildirilmemiştir, sadece bir omurga hastasında viral bulaşma vakası (1988'de bir omurga hastasına HIV bulaştırma) bildirilmiştir. Yazarlar, allogreftlerin güvenliğini optimize etmek için doku kaynağının yanı sıra o tesiste kullanılan sterilizasyon teknikleriyle ilgili iyi bir fikir edinmenin de uygun olabileceğini tavsiye etmişlerdir.

2.2.3.3 Zenogreftler : Hayvanlardan elde edilen bu greftlerdeki potansiyel immun yanıtın oluşmasını engellemek için antijenitelerinin yok edilmesi gerekir. Ayrıca hastalık taşınma riskini sıfıra indirgemek için greftin hazırlanmasında kimyasal

olarak yıkamaya ve gama sterilizasyona tabi tutulurlar. Böylece antijenite özellikği gösteren tüm protein yapıdaki maddeler uzaklaştırılır. Tüm bu işlemlerden sonra greftin osteoindüktif özelliği kaybolur, geriye sadece osteokondüktif özelliği kalır. Bazı çalışmalarda ksenografte otojen kemik iliği eklenerek greftleme yapılmış ve iyi sonuçlar bildirilmiştir (**44**).

2.2.3.4 Seramikler : Biyosentetik seramikler yüksek ısı ile işlenen metal olmayan, solid ve inorganik materyallerdir. Seramikler yüksek osteokondüktif kapasiteye ve biyouyumluluğa sahiptirler ancak osteoindüktif ve osteojenik özellikleri yoktur. İmmun yanıt oluşturmamaları allogreftlere göre önemli avantajlarıdır. Füzyon sahasında kemiğin iyileşmesini başlatacak olan hücrelerin migrasyonu ve yayılımı için çok iyi bir yapı iskelesi vazifesi görürler. Kemik oluşumunun son basamaklarında ise rezorbe olmaları beklenir.

Hidroksiapatit (HA) , trikalsiyum fosfat (TCP), kalsiyum sülfat ve bunların farklı kombinasyonları günümüzde özellikle spinal füzyonda sık olarak kullanılır. HA yavaş emilen seramikler grubunda iken, TCP , kalsiyum sülfat ve biyoaktif cam ise hızlı emilen seramikler arasındadır.

TCP farklı kristalin yapılarına sahip alfa ve beta formu olan son 30 yıldır sentetik kemik boşluğu doldurucu olarak kullanılan bir materyaldir. Beta- TCP formunun porozitesi alfa formdan daha fazladır, dolayısıyla osteokondüktif özelliği daha iyidir. Özellikle ultraporöz beta-TCP normal kansellöz kemikle benzer düzeyde gözeneğe sahiptir (**45**). Genel olarak beta-TCP formunun 1-1000 mikrometrelik porozite dağılımı vardır ve bu dağılımın %75 i 100 mikropor

hacminden daha büyüktür. Bu oran yapılan çalışmalarda osteokondüksiyon için ideal olarak belirlenmiştir (**45,46**).

Hidroksiapatitin kolay elde edilebilir olması bir avantaj gibi görünmesine rağmen rezorbsiyonunun yavaş olması ve kırılganlığının fazla olması nedeniyle klinik kullanımda tek başına kullanımı ideal değildir. Sıklıkla rezorbsiyonu hızlandıran başka formlarla birlikte kullanılır. **Tablo 3'** de biyosentetik seramik greft materyallerinin özellikleri verilmiştir.

	Rezorbsiyon Hızı	**Porozite/osteokondüksiyon**
Hidroksiapatit (HA)	Yavaş	Düşük
Beta- TCP	Orta	Yüksek
Alfa- TCP	Hızlı	Orta
Kalsiyum sülfat	Çok hızlı (kullanılmıyor)	Çok düşük

Tablo 3. Seramik greftlerin özellikleri.

2.2.3.5 Koral (Mercan) Greftler : Omurgasız deniz canlılarının içinde yaşamak için oluşturdukları kalsiyum ve fosfattan oluşan strüktürel yapıya mercan denir. Mercan yapısının makroskopik olarak kemiğe benzemesi nedeniyle üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Yüzde 97 oranında aragonit formlu kalsiyum karbonattan

oluşan doğal koralin, hidrotermal yöntemlerle saf olarak hidroksiapatite (HA) dönüştürülmüştür. “Porites” ve “Goniopora” türü mercanlardan elde edilen koral HA greftlerin iyi ve güvenilir bir greft materyali olduğu konusunda birçok çalışma mevcuttur (**47,48**).

2.2.3.6 Diğer Greft Tipleri :

Demineralize Kemik Makriks (DBM) : Hidroklorik asit vasıtasıyla kalsiyum hidroksiapatitin kemikten uzaklaştırılması ile elde edilen bu materyal kollojen, nonkollajen proteinler (osteokalsin, osteopontin ve osteonektin gibi) ve büyüme faktörlerini içerir. DBM in içeriğindeki en etkili faktörlerden biri kemik morfojenik proteindir (BMP). BMP nin de içinde olduğu kemik matriks içindeki faktörler osteoindüktif özelliği ile yeni kemik oluşumunu destekler. Zayıf osteokondüktif özelliği nedenli grefte yük binen durumlarda kullanılmamalıdır. DBM in kullanıldığı spinal füzyon modellerinde füzyon oranının dondurulmuş allogreftlerden daha iyi olduğu gösterilmiştir.

BMP (Kemik Morfogenetik Protein) ve Büyüme Faktörleri : BMP, transforming growth faktör- beta (TGF-B), insülin –like growth faktör 1 (IGF-1), PDGF (platelet derived growth faktör), FGF (fibroblast growth faktör) gibi faktörler hücresel aktivitenin lokal regülatörü olarak işlev gören özel polipeptidlerdir. Bunların içinde BMP spinal cerrahide kullanım alanı bulmuştur (**49,50**).

Kemik İliği Aspirasyonu (KİA) : Osteoprogenitör hücrelerin en önemli kaynağıdır. Özellikle osteokondüktif özelliği yüksek olan greft materyalleri le karıştırılarak kullanıldığında başarılı füzyon oranları bildiren çalışmalar

mevcuttur.Kemik greftlemesinde kullanılan materyallerin olumlu ve olumsuz yönleri özet olarak **Tablo 4'** de verilmiştir.

	Avantajlar	**Olumsuz özellikler**	**Ortalama füzyon oranı**
Otojen greft	Osteojenik, osteoindüktif, osteokondüktif	Ek morbiditeler, Sınırlı miktarlarda elde edilir.	İdeal greft, %60-100
Allogreft	Osteokondüktif ve zayıf osteoindüksiyon	Potansiyel hastalık geçişi, immunojenite olasılığı	%60-90
Seramikler	Güçlü osteokondüksiyon, Yüksek biyouyumluluk	Osteojenik ve osteoindüktif özellikler yok	Spinal cerrahide otogreft ile aynı mükemmel sonuçlar var (%60-100)
DBM	Osteoindüktif	Pahalı	%60-70
Zenogreft	Osteokondüktif	İmmunojenite olasılığı	%50-90

Tablo 4. Çeşitli greft materyallerinin olumlu ve olumsuz yönleri.

2.3 Karbon Nanotüpler

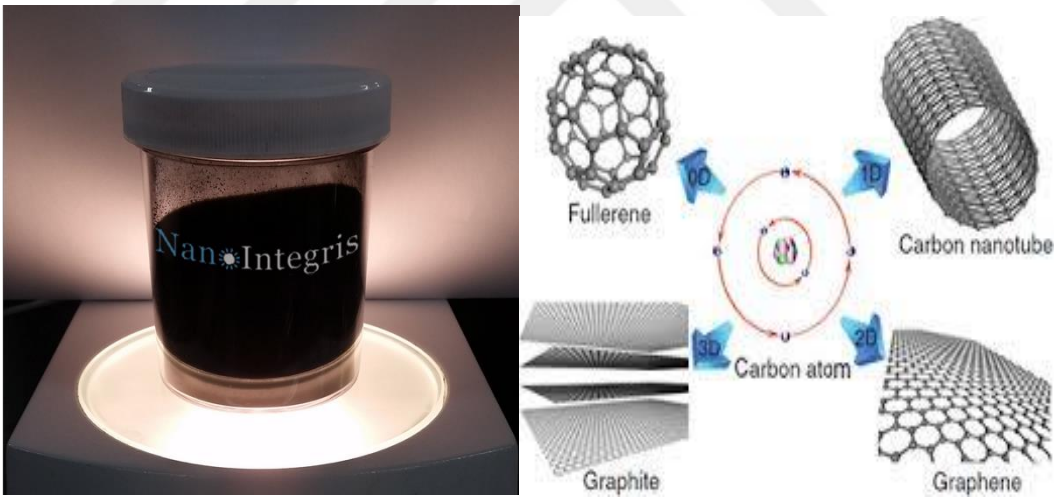
2.3.1 Genel Bilgiler

"Mikroteknololojiden daha küçük teknoloji" olarak adlandırılan nanoteknoloji, atomik ölçekte gerçekleştirilen işleme teknolojisidir (**51**). Nanoteknoloji ile ilgili çalışmalar malzemelerin geliştirilmesi için büyük önem taşımaktadır. Atomik seviyede görüntüleme, ölçme ve işleyebilme sayesinde istenilen özellikler verilerek malzemelerin geliştirilmesi sağlanabilir. Bu işlemler sayesinde boyutları 1 ile 100 nm arasında değişen, gelişmiş özellikli malzemeler ortaya çıkartılabilir.

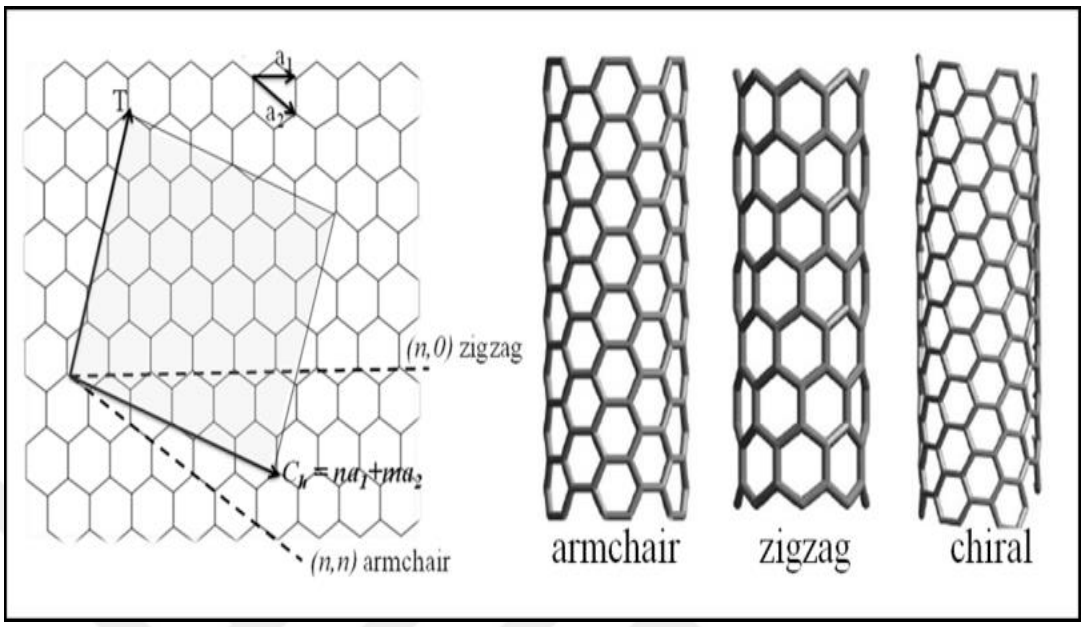
Karbon nanotüpler (KNT) ilk defa 1991 yılında LijimaTarafından keşfedilmiştir (**52**). Tek sıra karbon atomundan oluşan bir grafen katmanının, silindir şeklinde bükülerek uçlarının birleştirildiği ve grafen içerisindeki bağların aynısından oluşturulduğu düşünülürse bu yapı tek duvarlı bir karbon nanotüple aynı yapı olur. Karbon nanotüpün uzunluk /çap oranı $28x10^6$:1 dir ve bu oran başka herhangi bir malzemenin sahip olabileceğinden çok daha büyüktür.

Karbon, periyodik cetveldeki en ilginç elementlerden biri olup grafit (kurşun kalem, katı yağlayıcılar gibi) ve elmas gibi gündelik hayatta bildiğimiz allotroplara sahiptir. Bunun yanısıra karbon atomlarının sp2 melezleşmesi yaparak oluşan bal peteği örgülü yapılarından biri olan grafen 2004 yılında sentezlenerek nanoteknolojide çığır açılmıştır. Çünkü bu bal peteği yapısındaki grafen allotropu karbon nanotüp ve fulleren (C60) gibi formların yapıtaşıdır **(Şekil 2)**.

KNT' ler çapları 2-100 nm, boyları ise 5- 550 nm olarak üretilebilirler. Üretimlerindeki işleme göre tek duvarlı, iki duvarlı veya çok duvarlı KNT' ler olarak farklı formlarda olabilirler. Tek duvarlı karbon nanotüpler (TDKNT), bir tane grafen tabakanın silindirik hale gelmesiyle oluşurken, iki duvarlı karbon nanotüpler (İDKNT) ve çok duvarlı karbon nanotüpler (ÇDKNT) ise grafen takabalarının iki tane ya da onlarcasının bir araya gelmesiyle oluşmuş yapılardır. ÇDKNT içeriğindeki grafen takalarının dizilişine göre de pek çok değişik ÇDKNT formu (zig zag, koltuk, kiral gibi) vardır **(Şekil 3)**.



Şekil 2. a) İşlenmemiş ticari KNT formu. b) Karbon formları olan Grafen, fullaren, grafit ve KNT nin şematik gösterimi.



Şekil 3. Çeşitli ÇDKNT formları.

2.3.2 Karbon Nanotüplerin Tıpta Kullanım Alanları

KNT' ler, elde ediliş yöntemlerinin gelişmesiyle birlikte günümüzde birçok sektörde kullanım alanı bulmuştur. Bu materyaller enerji depolamada (piller ve akümülatörler, hidrojen depolama gibi), hava ve suyun temizlenmesinde kullanılan filtrelerde, çeşitli gaz tayinlerinde kullanılan sensörlerde, elektronikte, uzay bilimlerinde, tıpta, tekstilde, spor malzemeleri üretiminde ve askeri araçların üretimi gibi daha birçok alanda üretilen malzemelerde kullanıma girmiş ve geleceğin teknolojisi olarak görülmeye başlanmıştır. Daha duyarlı analizler sağlamak amacıyla biyobelirleyici (biyomarker) tabanlı proteomik ve genomik teknolojilerde, manyetik rezonans, floresan gibi radyolojik alanlarda, moleküler görüntüleme, ilaç geliştirme sistemleri, hedefe yönelik tedavi, aşı geliştirmesi gibi

amaçlarla kullanılmaktadır. Çok hafif olmaları, yüksek elastik modülüse sahip olmaları, çok büyük yüzey alanlarına sahip olmaları ve bilinen en dayanıklı fiber olma ihtimalleri bu materyaller üzerindeki çalışmaların daha da detaylandırılmasını sağlamaktadır.

Tıp alanında KNT lerin kullanılması çok yenidir. İlk olarak sağlık sektöründe ilaç ve aşı veriliş sistemlerinde, iletken polimer karışım yapıları gibi biyomateryallerin hazırlanmasında kullanılmaya başlanmıştır (**53,54**). KNT ler kullanılarak çeşitli protein sensörleri hazırlanmıştır. Biyolojik ortamlarda antijenleri belirlemek için antikorları üzerinde barındıran yapı iskelesi olarak kullanılmaya başlanmıştır (**55**).

KNT lerin en önemli özelliği membranlarından geçme eğilimlerinin fazla olmasıdır. Bir floresans ajanla etkilenen KNT in kolayca hücre içine geçebildiği, sitoplazmada ve hatta özel mikroskoplar yardımı ile hücre çekirdeğinde takip edilebildiği gösterilmiştir (**56**). Bu özelliklerden faydalanılarak sığır serum albümini ve tümör için geliştirilmiş antikor içeren KNT lerin diğer çözeltilere göre karaciğer ve dalakta daha çok biriktiği, aynı zamanda serbest ilaca göre tümör dokusunda çok daha yüksek konsantrasyonda bulunduğu bildirilmiştir (**57**).

Bazı araştırıcılar tarafından nanotüpler ve asbest lifleri arasında fiziksel benzerlik olduğu ileri sürülmüştür. 1960' lardan beri asbestin akciğer kanserine ve mezotelyomaya sebep olduğu bilinmektedir. Nanopartiküllerin de asbest gibi insan vücudunda en önemli giriş ve hedef organı akciğerlerdir. Özellikle işlem görmemiş KNT lerin vücutta kompleman sistemini ve proteinlerini aktive ettiği,

ancak yüzeylerinin polietilen glikol ile kaplanmasının kompleman cevabını azalttığı bildirilmiştir (**58,59**).

2.3.3 Karbon Nanotüplerin Kemik Greftleri İle Birlikte Kullanımı

Karbon nanotüpler, iyi mekanik özelliklerinin yanısıra yüksek gerilme mukavemeti ve esneklik gibi yapısal ve fizikokimyasal özellikleri nedeniyle ilgi görmeye başlamıştır. Karbon nanotüplerin 0,5-2 nm çapları, 0,2-0,7 g / cm^3 yoğunluğu ve 10^3- 10^4 en-boy oranı gibi benzersiz yapısal boyutları takviye edici bir ajan olarak mükemmel özelliklere sahiptir. Buna ek olarak yapılarında çok güçlü bağlar olduğu için KNT' ler bilinen kimyasal çözücülerle dağılmazlar yani inerttirler.

KNT' ler, hidroksiapatitin dayanımını ve tokluğunu artırmak için bir takviye malzemesi olarak çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır. Aslında kırılgan hidroksiapatit seramik matriksin biyouyumluluğundan ödün vermeden mekanik özelliklerini geliştirmek için HA ile çinko, magnezyum, gümüş, zirkonya, alümina ve titanyum gibi maddeler birlikte kullanılmıştır. 2015 yılında Mukheriee ve arkadaşları güçlü bir hidroksiapatit esaslı implant materyali geliştirmek için farklı KNT miktarlarını kullanarak HA/KNT biyokompoziti oluşturup fiziksel, mekanik ve tavşanlarda in-vivo etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmada KNT' lerin farklı konsantrasyonlarında hidroksiapatinin mekanik mukavemetinin belirgin olarak arttığını ve KNT' lerin kullanıldığı en %5' lik en yüksek konsantrasyonlarda bile hemoliz oranlarının belirgin artmadığını yani işlenmiş formdaki KNT' lerin belli dozun üzerine çıkılmadığında sitotoksik olmadıklarını belirtmişlerdir (**60,61,62**).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma T.C Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı tarafından verilen 29/12/2015 – 149691 tarih ve evrak sayılı etik kurul onayı ile yürütülmüştür. Çalışma sürecinde Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi (GÜDAM), Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Laboratuvarı, Hacettepe Üniversitesi Makine Mühendisliği Beytepe Yerleşkesi Laboratuvarı, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı Mikro Bilgisayarlı Tomografi (Micro- CT) laboratuvarı, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Elektron Mikroskop Laboratuvarı ve Maden Tetkik Arama Elektron Mikroskopi Laboratuvarı ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabililim Dalı Laboratuvarı kullanılmıştır.

Bu çalışmada omurga cerrahisinde sıklıkla uygulanan prosedürlerden biri olan posterolateral füzyonda kullanılmak üzere karbon nanotüp (KNT)-hidroksiapatit-trikalsiyum fosfat (HA-TCP) içerikli biyokompozit materyal in vitro ortamda oluşturulmuş ve rat modeline implante edilerek füzyon oranları çeşitli yöntemlerle değerlendirilmiştir.

Çalışmada 20 adet Spraque- Dawley ratı kullanılmıştır. Ratlar 5'erli 4 gruba ayrılmıştır. Tüm gruplara standart cerrahi lomber orta hat insizyonu yapılarak L4-L5 vertebra segmentler seviyesinde posterior arklar açığa çıkartılarak lamina ve transvers prosesleri dekortike edildi, fasetektomi uygulandı. İlk gruba herhangi bir greft materyali uygulanmadı (dekortikasyon grubu). İkinci guruba in vitro hazırlanan 2 X 5 mm boyutlarında iki adet KNT (her iki

intertransversal greft yatağına), üçüncü gruba ise 1200 mg HA-TCP sentetik greft (Adbone®BCP, medbone, UK) (her iki intertransversal greft yatağına 600mg+600mg), dördüncü gruba ise %3.2 KNT içeriği olan 2 X 5 mm'lik iki adet KNT/ HA-TCP biyokompoziti uygulanmıştır. Her gruba aynı cerrahi prosedür uygulanarak cerrahi kapatma işlemi uygulanmış ve ratlar aynı ortamda 2 ay boyunca takip edilmiştir. Bu süreçte hayvanların 2., 4., 6. ve 8. hafta X-ray görüntüleri hayvan laboratuvarında bulunan röntgen cihazı ile görüntülenmiştir. Sekizinci hafta sonunda tüm hayvanların yüksek doz anestezi ile ötenazisi sağlandıktan sonra L2- L5 arası lomber segmentleri çevre yumuşak dokuları ile birlikte çıkarılmış ve manuel palpasyonla değerlendirmesi yapıldıktan hemen sonra %10 luk formaldehit solüsyonuna alınmıştır. İki gün içerisinde her gruptan 2' şer hayvana biyomekenik üç nokta eğilme testi yapılmıştır. Sonrasında tüm hayvanlara mikro- BT görüntülemesi yapılmıştır. Sonrasında örnekler histolojik değerlendirmeler için Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabililim Dalı Laboratuvarına teslim edilmiştir.

3.1 Karbon Nanotüp/Trikalsiyum Fosfat Kompozitin Hazırlanması

Çalışmamızda ilk olarak "Çok Duvarlı Karbon Nanotüpler (ÇDKNT)" ve ÇDKNT / HA-TCP biyokompoziti Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Laboratuvarında oluşturulmuştur.

ÇDKNT membranların ve ÇKKNT/ TCP kompozitin hazırlanması **Tablo 5**' de gösterilmiştir.

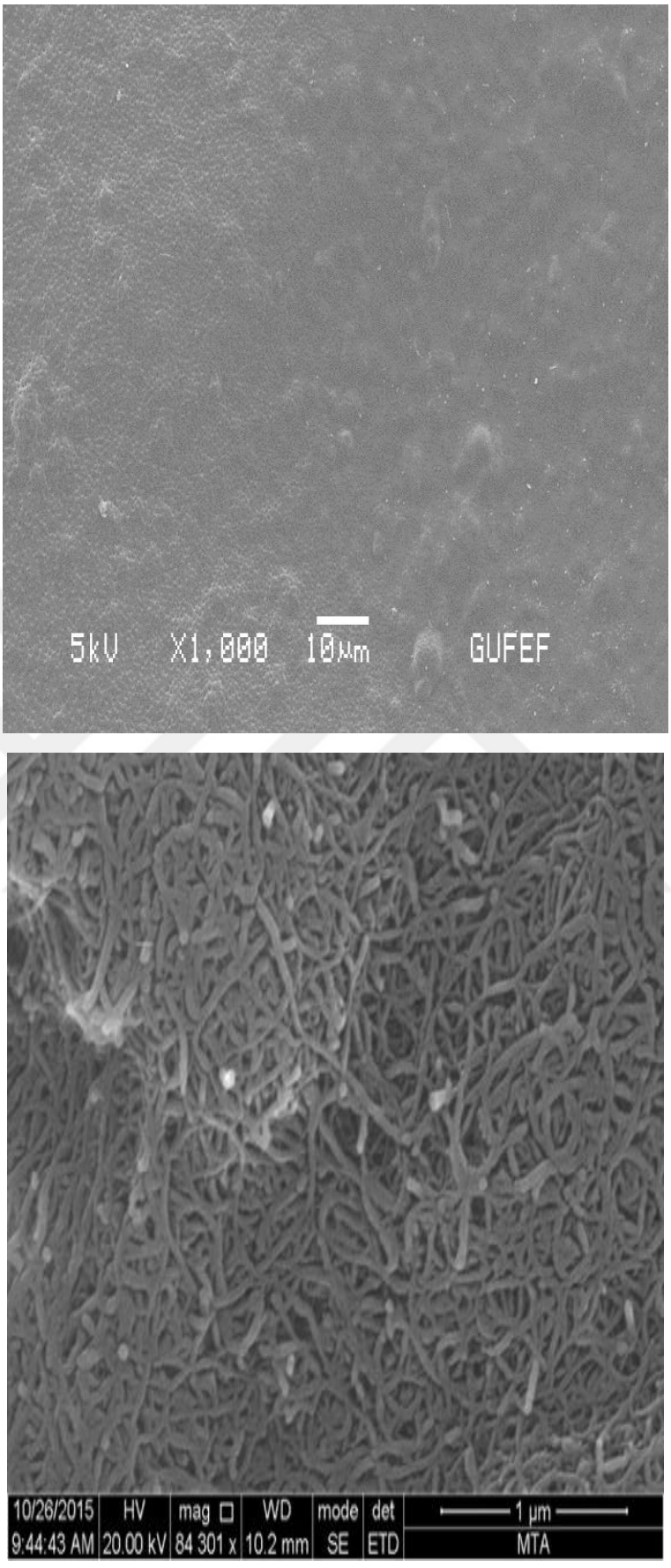
ÇKKNT hazırlanması	ÇDKNT/ TCP kompozitin hazırlanması
a. **20 mg ÇKKNT** (Nanocyl 3101, Belçika) ve **1 mL triton X** (Triton® X100, Sigma, USA) spatülle karıştırılır. ↓ b. 100 mL distile su konulur. ↓ c. 30 dk **ultrasonik banyoda** (Brainsonic 221, Almanya) bekletilir. ↓ d. 2 dk **ultrasonik homojenizatörde** (Sonics Vibra Cell 500W) bekletilir. ↓ e. **Selüloz nitrat filtreden** (Sratorius Stedim Biotech GmbH, Almanya) süzülür. ↓ f. Distile su ilave edilip yıkanır. ↓ g. **Asetonlu** petri kabına alınır. Selüloz nitrat filtre eridikten sonra yağlı kağıt üzerine alınır. ↓ h. Etüvde 40 °C'de kurutulur.	a. **20 mg ÇKKNT** + **1 mL triton X** spatülle karıştırılır. ↓ b. **600 mg HA-TCP** (Adbone®BCP, UK) karıştırılır. ↓ c. 100 mL distile su konulur ↓ d. 30 dk **ultrasonik banyoda** bekletilir. ↓ e. 2 dk **ultrasonik homojenizatörde** bekletilir ↓ f. **Selüloz nitrat filtreden** süzülür. ↓ g. Distile su ilave edilip yıkanır. ↓ h. **Asetonlu** petri kabına alınır. Selüloz nitrat filtre eridikten sonra yağlı kağıt üzerine alınır. ↓ i. Etüvde 40 °C'de kurutulur.

Tablo 5.ÇDKNT membranlar ve ÇDKNT/TCP kompozitin hazırlanması.

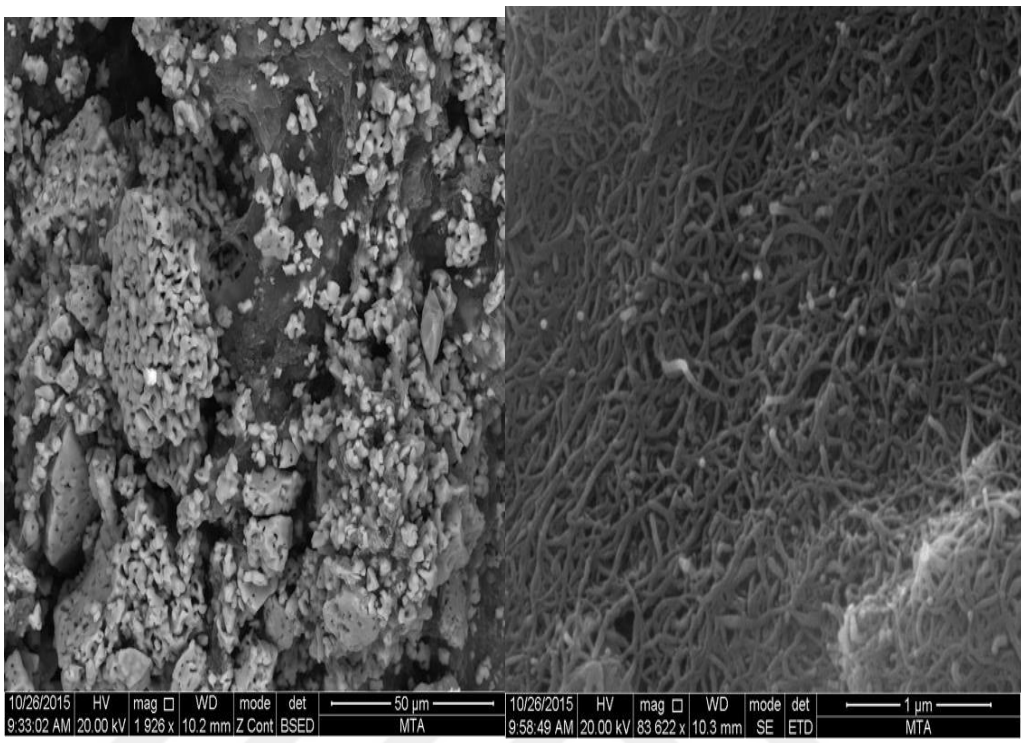


Şekil 4. Hazırlanan ÇDKNT membranlar (alt sıra) ve ÇDKNT/ HA-TCP kompozitler (üst sıra).

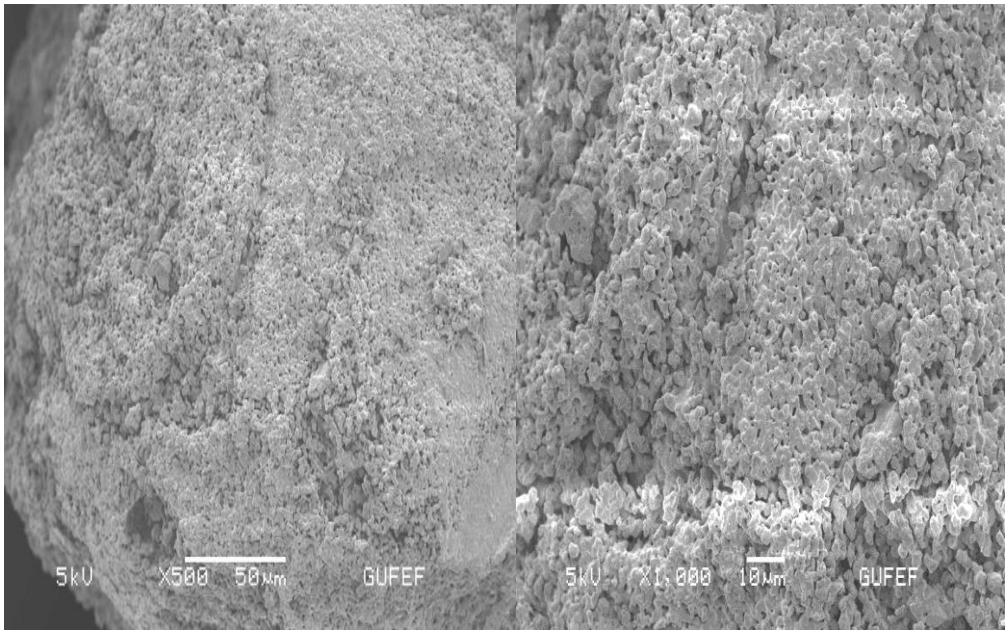
Hazırlanan ÇDKNT membranlar, ÇDKNT/ HA-TCP kompozitleri ve HA-TCP sentetik greftleri taramalı elektron mikroskopu (SEM) kullanılarak incelenmiştir **(Şekil 5, 6, 7)**.



Şekil 5. ÇDKNT membranın, (üst resim) 10 mikronluk alanda, (alt resim) 1 mikronluk alandaki SEM görüntüleri.



Şekil 6. (a,b) ÇDKNT/HA-TCP kompozitin, a) 10 mikronluk alanda, b) 1 mikronluk alandaki SEM görüntüleri.



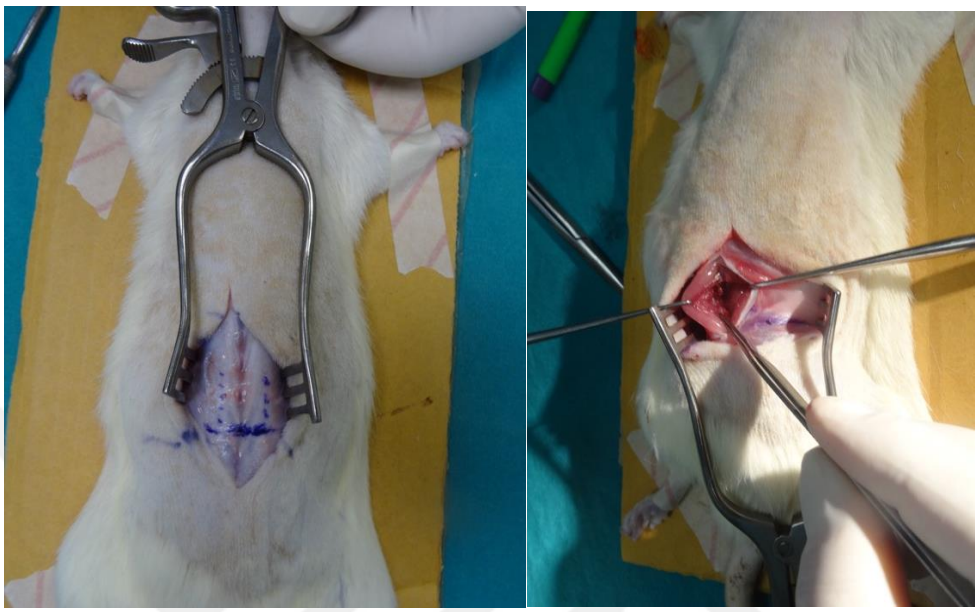
Şekil 7. a,b) HA-TCP' nin 50 mikronluk ve 10 mikronluk alandaki SEM görüntüleri.

3.2. Cerrahi Teknik

Ratlar cerrahi işlem öncesi intramusküler olarak 45 mg /kg ketamin ve 5 mg/kg ksilazin uygulanarak uyutulmuşlardır. Hayvanlar anestezi sonrası prone pozisyonda yatırılarak her iki alt ve üst ekstremiteleri ile kuyrukları yapışkan bant ile sabitlenmiştir. Ardından torakolomber alanları tıraş makinesi yardımı ile traş edilmiş ve cerrahi alan Baticon (100 ml de %10 luk serbest iyot içeren 10 gr polyvidon iodin) ile temizlenmiştir **(şekil 8)**. Cerrahi alan temizliğinin ardından lomber bölgede L2 –L5 arasında orta hat cilt insizyonu longitudinal olarak yapılmıştır. Cilt ve cilt altı dokular geçildikten sonra Wiltse (63,64) yaklaşımı ile her iki paravertebral kas dokuları geçilerek L3-L5 arası posterior arka, faset eklemlere ve transvers çıkıntılara ulaşılmıştır **(şekil 9)**.



Şekil 8. a,b) Deneklerin cerrahiye hazırlanması.



Şekil 9. L2- L5 arası orta hat longitudinal insizyonu ile cilt, cilt altı dokuların geçilmesi ve Wiltse yaklaşımı ile bilateral paravertebral kas planları arasından posterior kemik arka ulaşılması.

Sonrasında elektrikli burr cihazı ve küçük rounger yardımı ile posteriyor ark ve transvers çıkıntılara dikkatli bir biçimde dorsal dekortikasyon uygulanmıştır. Grup 1 (dekortikasyon) deki 5 deneğe dekortikasyonu takiben herhangi bir greft materyali uygulanmadan cerrahi kapatma işlemine geçilmiştir. Grup 2 deki 5 deneğin dekortikasyonla hazırlanan L4-L5 intertransversal yataklarına in- vitro ortamda hazırlanan 2 X 5 mm lik KNT' ler bilateral olarak yerleştirildi. Üçüncü gruptaki 5 deneğin herbirine toplam 1200 mg HA-TCP (Adbone®BCP, medbone, UK) (her iki intertransversal greft yatağına 600mg+600mg) olarak uygulandı. Son olarak dördüncü gruptaki 5 hayvanın hazırlanan intertransversal bölgelerine ise

2X5 mm boyutlarında hazırlanan %3.2 lik KNT/ HA-TCP kompozit materyaller bilateral olarak uygulandı (**Şekil 10**). Ardından cerrahi kapatma işlemine geçilmiştir. Bu işlem her denek için aynı olup paravertebral kaslar ve fasya 3.0 vicryl ile, cilt ise 4.0 prolen ile tek tek dikilmiştir (**Şekil 11**).

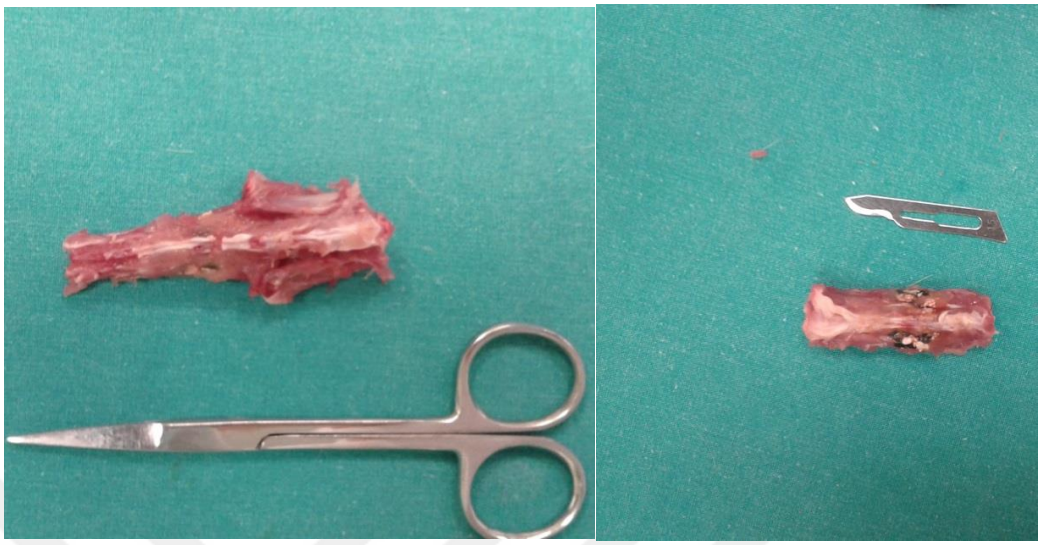


Şekil 10. a) Hayvanların L4-L5 seviyesinde posterior ark ve transvers çıkıntıların elektrikli burr cihazı ve küçük rounger yardımı ile dekortikasyonu sonrası 2X5 mm lik hazırlanan ÇDKNT ve ÇDKNT/HA-TCP materyallerinin intervertebral yatağa uygulanması. b) KNT membran parçası. c) ÇDKNT/ TCP-HA parçası.



Şekil 11. a,b) Postoperatif tüm cerrahi katların kapatılması ve birinci hafta yara yeri görüntüsü.

Cerrahi sonrası erken dönemde analjezi ihtiyacı gözlemlenmemiş olup herhangi bir analjezik ajan verilmemiştir. Deneklere cerrahi sonrası profilaktik antibiyotik verilmemiştir. Her grup kendi kafesinde optimum şartlarda 2 ay süreyle beslenmiştir. Bu süreçte deneklerde ölüm veya herhangi bir morbidite gözlenmemiştir. Hiç bir denekte cerrahiye bağlı yara yeri sorunu gözlenmemiştir. Deneklerin 2. ,4., 6. ve 8. hafta X-ray görüntüleri hayvan laboratuvarında bulunan röntgen cihazı ile görüntülenmiştir. Sekizinci haftanın sonunda tüm hayvanlar yüksek doz intramusküler anestezi ile sakrifiye edilmiştir. Ardından tüm deneklerin dorsolomber cilt kesileri tekrarlanmış ve posterior kas ve bağ dokularına zarar vermeden L4- L5 segmenti füzyon açısından manuel palpasyonla değerlendirilmiştir. Ardından L2-L3 intervertebral diski ve pelvisi arasındaki lomber segmentleri kemik yapıya zarar vermeden çıkartılmıştır **(Şekil 12)**.



Şekil 12. Sakrifikasyon sonrası çıkarılan lumbosakral segment. Füzyon alanına zarar vermemek için büyük segment olarak çıkarılmıştır, sonrasında ise keskin bistüri ile L2-L3 diski ile L6-S1 diski arasındaki segment kalacak şekilde dış ortamda küçültülmüştür.

Her gruptan 2' şer hayvana biyomekenik üç nokta eğilme testi örnekler elde edildiği gün yapılmıştır. Tüm örnekler %10 luk tamponlu formaldehit solüsyonunda 48-72 saat boyunca tespit edilmiştir. Ardından tüm örneklere mikro-CT görüntülemesi yapılmıştır. Sonrasında örnekler histolojik değerlendirmeler için histoloji laboratuvarına teslim edilmiştir.

3.3 Manuel Palpasyonla Değerlendirme

Tüm deneklerin yüksek doz anestezi ile sakrifikasyonlarının ardından dorsolomber cilt kesileri tekrarlanmış ve posterior kas ve bağ dokularına zarar vermeden L4- L5 segmenti füzyon açısından manuel palpasyonla değerlendirilmiştir (65). Bu değerlendirmede L4-L5 segmentinde hareketsiz solid

kitle saptanmışsa 2 puan, bir miktar hareket saptanmışsa 1 puan, belirgin hareket saptanmışsa 0 puan verildi.

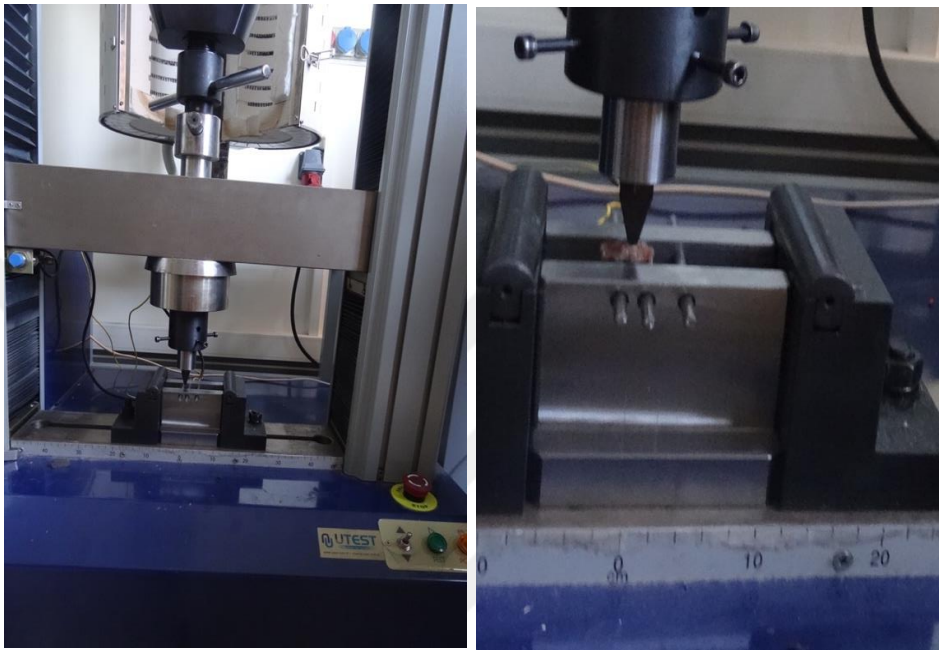
3.4 Radyolojik Değerlendirme

Hayvanların 2. ,4., 6. ve 8. hafta X-ray görüntüleri hayvan laboratuvarında bulunan röntgen cihazı ile görüntülenmiştir. Bu işlem sırasında ratlar pron pozisyonda sıkıca sabitlenerek kısa süreli hareketleri engellenmiştir. Görüntüler ön- arka pozisyonda çekilmiştir. Hayvanlar ile rötgenin ışık kaynağı arasındaki mesafe 90 santimetre olup 45 kV 5.5 mAS ‘ de 23 milisaniye (msec) içinde çekilmiştir. Çekilen grafiler değerlendirilirken L4-L5 intertransversal segmentler arasındaki mesafe göz önüne alınarak sıfır ile 10 puan arasında bir skala oluşturulmuştur. Bu skalada intertransversal mesafede hiç kemik yoğunluğu olmaması sıfır puan iken, intertransversal mesafenin tamamen füzyonu 10 puan almıştır. Ölçümler her hayvan için bilateral olarak yapılarak ortalaması alınmıştır.

3.5 Biyomekanik Değerlendirme

Her gruptan 2’ şer tane olmak üzere toplam 8 adet numuneye Hacettepe Üniversitesi Makine Mühendisliği Beytepe Yerleşkesi Laboratuvarında 3 nokta eğilme testi uygulanmıştır. Test, Utest 50 kN eksenel yük uygulayabilen servo mekanik test aleti ile gerçekleştirildi. Test örneklerinin üzerine yerleştirildiği destekler arası mesafe 10 mm, destek yarıçapları 2,5 mm ve üst anvil (bükme aparatı) yarıçapı 1,5 mm’dir. Örnekler desteklar arasına füzyon alanı gelecek şekilde yerleştirilmiş, sonrasında bükme aparatı füzyon bölgesinin tam ortasına

gelecek şekilde yerleştirilmiştir. Test örneklerine kırılıncaya kadar 1 mm/dk deplasman hızıyla yükleme yapılmıştır (**Şekil13**).



Şekil 13. Üç nokta eğilme testinin yapıldığı cihazın görüntüsü. (Servo U-Test)

3.6 Mikro Bilgisayarlı Tomografi İncelemeleri ve Değerlendirme

Mikrotomografi incelemesi için tüm hayvanlardan elde edilen omurga segmentleri %10 luk formaldehit solüsyonuna içerisinde üç gün fikse edildi. Üç günün sonunda örnekler, ışınlama işlemine kadar bekletilmek üzere etanol çözeltisi içerisine konuldu. Örneklerin mikrotomografi görüntülenmesi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Alınan örnekler, mikro- BT cihazının (Skyscan 1174,Skyscan, Kontich Belgium) tarayıcı bölmesine patafiks aracılığı ile sabitlendi. 800 mikroamper (μA), 50 kilovolt (kV) ve 33 μm piksel boyutlarında alan düzeltmesi ayarlanıp kaydedildikten sonra, her

bir örnek aynı alan düzeltme ayarları ile tarandı. Mikro-BT'nin rotasyon basamağı 0,7° ayarlanmış, her biri 4000 milisaniye (ms) maruziyete kalacak şekilde 3 frame ve her bir örnek 180 derece rotasyonlu tarama yapılacak şekilde belirlendi. Her bir örneğin taranması yaklaşık 1 saat sürmüştür. Bu tarama aşamasında elde edilen ham verilerin daha sonraki rekonstrüksiyonları üreticinin sağladığı NRecon (NRecon versiyon 1.6.9.4 , Skyscan, Kontich, Belgium) yazılımı ile yapılmıştır. Rekonstriksiyon sırasında ışık sertleşme oranı %40, halka artifact redüksiyon, smooting, frame avering her bir örnek için bireysel olarak optimum değere ayarlandı. NRecon kullanılarak rekonstrükte edilen 8 bit gri görüntüler CTAn (versiyon 1.13.5.1) yazılımına aktarıldı. 4 mm çapındaki silindir "bone mineral density" (BMD) (Bone mineral density (BMD) is defined as the volumetric density of calcium hydroxyapatite (CaHA) in terms of g.cm³.) çubukları ile analiz sonuçlarının güvenilirliği için kalibrasyon işlemi yapıldı. Bu kalibrasyon işlemi için 0.25 g.cm³ ve 0.75 g.cm³ 4 mm çapındaki iki BMD çubuğu numunelerle aynı şartlarda ve ayarlarda tarandı. Ardından histogram değerleri CTAn yazılımına kalibrasyon sonrası işlendi. CTAn yazılımında, defekt sınırları tespit edilerek, analizin yapılabilmesi için üst ve altı sınırlar belirlenmiş ve arada kalan görüntülerden defekt alanları belirlenerek ROI (region of interest) seçildi. Seçilen ROI bölgelerinden CTAn yazılımı aracılığı ile kemik hacmi, kemik yüzey alanı, yumuşak doku hacmi, yumuşak doku yüzey alanı, kemik/yumuşak doku oranı, kemik yoğunluğu vb. temel değerler elde edildi. Hacimsel olarak kemikleşme oranı ölçülerek, tüm defekt hacmine göre yüzdesel değeri hesaplandı (kemik hacmi/ doku hacmi). İncelenen doku hacimleri her örnekte farklı olduğu için

kemik hacmi/ doku hacmi (bone volume (BV) / tissue volume (TV)) yüzdeleri değerlendirmeye alındı (**66,67**).

3.7 Histolojik Değerlendirme

Hematoksilen-Eosin (HE) Boyama Protokolü: Tüm gruplardan alınan doku örneklerinin formik asit-formalin solüsyonunda dekalsifikasyon işlemi gerçekleştirilmiş daha sonra rutin histolojik işlemlerden geçirilmiştir. Deney gruplarına ait parafin bloklardan 4 μm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler deparafinizasyon işlemi için, 37°C'lik etüvde bir gece kaldıktan sonra, etüv ısısı 57°C'ye çıkarılarak 1 saat süresince bekletildi. Deparafinizasyon işlemini tamamlamak için kesitler 2 kez 20'şer dakika ksilolde bırakıldı. Rehidratasyon işlemi için azalan etil alkol serilerinde (%100, %90, %80, %70 ve %50) 10'ar dakika tutuldu. Kesitler havada kurutma işlemi tamamlandıktan sonra, 10 dakika akan musluk suyu ile yıkandı. Yıkama işleminin ardından 10 dakika Harris hematoksilen boya solüsyonunda tutulan kesitlerin akan musluk suyu altında 10 dakika yıkanması işlemi gerçekleştirildi. Kesitler glasiyel asetik asit-alkol solüsyonuna 2-3 kez batırılıp çıkarılarak akan musluk suyu altında 10 dakika yıkandı ve ardından 10 dakika Eosin boya solüsyonunda bekletildi. Tekrar 10 dakika akan musluk suyu ile yıkamanın ardından dehidratasyon işlemi için artan etil akol serilerinden (sırasıyla % 50, %70, %80, %90 ve %100'lük) hızlıca geçirilerek 45 dakika ksilolde bekletildi ve lamlar entellan ile kapatıldı. Hazırlanan kesitlerden Leica DM 4000B (Germany) bilgisayar destekli ışık

mikroskobunda elde edilen görüntüler, Leica Q Vin 3 programında değerlendirildi (**68**).

Masson's Trikrom Boyama Protokolü: Deney gruplarına ait parafin bloklarından alınan 4 μm kalınlığındaki kesitler deparafinizasyon işlemi için, 37°C'lik etüvde bir gece kaldıktan sonra deparafinizasyonun davamında etüv ısısı 57°C'ye çıkarılarak 1 saat daha bekletildi. Daha sonra kesitler 2 kes 5' er dakika ksilole alınarak deparafinizasyonları sonladırıldı. 2 kez 3 dakika %100'lük etil alkolden geçirildikten sonra sırasıyla %90, %80, %70 ve %50 azalan etil alkol serilerinden geçirildi. Kesitler daha sonra akan musluk suyunda yıkanarak boyamaya hazır hale getirildi. Kesitlere Atom Scientific BIOSTAIN Masson Trichrome Stain Kit – Methly Blue (Code : RRSK20-100) kiti uygulandı. Haematoxylin Weigert's A ve Haematoxylin Weigert's B solüsyonları eşit miktarda karıştırılarak Weigert Hematoksilen hazırlandı. Kesitler sudan geçirildi. Weigert' s demirli Hematoksilen ile 20 dk çekirdek boyaması yapıldı. Kesitler % 1'lik asit alkol solüsyonu içeren suda yıkandı. Ponceau Fuchsin solüsyonununda 5 dk boyama yapıldı ve deiyonize suda yıkandı. Kesitler % 1' lik fosfotungistik asit solüsyonu ile 10 dk mordanlaştırıldı. % 2.5' lik asetik asit - % 2' lik Metil Blue Solüsyonu ile 5 dk boyandı ve suda yıkandı. Alkol serilerinden geçirilerek ksilole alındı ve entellan ile kapatıldı (**69**).

İmmunohistokimyasal Boyama Protokolü: İmmünohistokimyasal boyamalar için parafin bloklarından polilizinli lamlara 4 μm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler,

37^{o}C' deki etüvde bir gece bekletilerek, daha sonra deparafinizasyonu hızlandırmak için ısısı 57^{o}C' ye çıkarılan etüvde 1 saat bırakıldı. Kesitler deparafinizasyonu sonlandırmak için 2 kez 20'şer dakika ksilolde bırakıldı. Ardından 10'ar dakika olmak üzere artan alkol serilerinden (sırasıyla %100, %96,%90, %80 ve % 70) geçirildi.

Dehidrate edilen dokular alkolden uzaklaştırılmak için 2 kez 5'er dakika distile su ile yıkandı. Daha sonra, dokulara sitrat tamponu (pH 6.0) (Cat: AP-9003-500, Lot: MK160509, Thermo Scientific, Fremont, USA) ile mikrodalga fırında retrival işlemi uygulandı. Mikrodalgada retrival işleminden sonra kesitler dışarıda 20 dakika soğumaya bırakıldı. Daha sonra dokular sitrattan arındırılmak için 2 kez 5'er dakika distile sudan geçirildi. Dokuların çevresi PAP-pen (Sigma, Cat: Z672548-1EA, Lot: 3110V ile çevrilerek nemli ortam olmasına dikkat edilen immünohistokimya barına dizildi. Dokular 3 kez 3'er dakika PBS (Phosphate Buffer Saline) (Ph:7.4) ile yıkandı. Daha sonra, 15 dakika %3'lük hidrojen peroksit (Cat: AP-9003-500, Lot: 9003LT13610, Lab Vision, Fremont, USA) ile etkin bırakıldı. İşlem sonrasında PBS ile lamlar yıkandı. Yıkanan lamlara 5 dakika UltraV block (Lot: AUB150113AC, Lab Vision, Thermo Scientific) uygulanarak, özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi sağlandı. Bu işlemden sonra dokular yıkanmadan primer antikor aşamasına geçildi. Bloklama aşamasının ardından kesitler yıkanmadan, 1/100 oranında hazırlanan Osteopontin (OPN) (AKm2A1) (SantaCruz, sc-21742), primer antikoruna etkin bırakıldı ve kesitler +4 derecede 1 gece inkübe edildi. Daha sonra primer antikordan sonra lamlar 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı. Yıkamanın ardından 10 dakika biotinli sekonder antikor

(Lot:PBN141111AE, Lab Vision, Thermo Scientific) uygulandı. Tekrar PBS ile yıkandıktan sonra dokular 10 dakika streptavidin peroksidaz enzim (Lot:SHR1150121AA, Lab Vision, Thermo Scientific) kompleksine etkin bırakıldı. İşlem sonrasında dokular yine 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı. Diaminobenzedin içeren (DAB) substratı (Lot: HD29884, Thermo Scientific) içeren kromojen DAB eklenerek yaklaşık 5-10 dakika bekletildi ve immün tepkimenin ortaya çıkması sağlandı. Zemin boyası olarak Mayer's hematoksileni kullanıldı. DAB ile boyanan lamlar azalan alkol serilerinden geçirildi. Ksilolde 20 dakika bekletildikten sonra entallan ile kapatılarak, bilgisayar destekli DM 4000 Leica Germany görüntülü analiz sisteminde incelenerek değerlendirildi (**70**).

Histolojik skorlama için Emery ve arkadaşlarının (**71**) histolojik değerlendirme ölçütlerinin modifiye edilmesi ile gruplardaki yeni doku oluşumları değerlendirildi (**Tablo 6**). Bunun için, deney gruplarında her 5 deneğe ait, her bir hayvana ait kesitte iki mikroskop alanı değerlendirildi.

Skor	Doku durumu
7	Sadece kemik doku
6	Kemik doku>Fibrokartilaj
5	Fibrokartilaj>Kemik doku
4	Sadece fibrokartilaj
3	Fibrokartilaj>Fibröz doku
2	Fibröz>Fibrokartilaj doku
1	Sadece fibröz doku
0	Boş “cleft”

Tablo 6. Emery ve arkadaşlarının tanımladığı histolojik puanlama (**71**)

3.8 İstatistiksel Değerlendirme

Bu çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi SPSS 21.0 Evaluation (SPSS Inc., Chicago, USA) programı kullanılarak yapılmıştır. Manuel palpasyon verileri için ki- kare testi; radyolojik, histolojik ve mikro –BT verileri için Kruskal- Vallis testi kullanılmıştır. İstatistiksel olarak $p<0,01$ değeri anlamlı kabul edilmiştir. Biyomekanik değerlendirme her gruptan 2 hayvana yapılabildiği için istatistiksel olarak değerlendirilememiş bunu yerine kuvvet / yer değiştirme ((Newton/ mm) oranlarının grafiksel sonuçları çalışmada yer almıştır.

4. BULGULAR

Makroskopik Değerlendirme ve Manuel Palpasyon

Tüm ratlar sakrifiye edildikten sonra eski insizyon yerinden tekrar cilt açılmıştır. dorsal fasya ve paravertebral kas tabakalarında makroskopik olarak herhangi bir enfeksiyon, dikiş reaksiyonu veya enflamatuar reaksiyon gözlenmemiştir. L4- L5 spinöz proçesleri belirlendikten sonra manuel palpasyonla bu seviyedeki füzyon derecesi değerlendirilmiştir. Grup 1' deki (sham grubu) 5 hayvanın hepsinde makroskopik olarak belirgin hareket mevcut olup manuel palpasyonla füzyonun gerçekleşmediği gözlenmiştir. Grup 2' deki (KNT) 5 hayvandan 2 tanesinde belirgin hareket olduğu, diğer 3 tanesinde ise çok belirgin olmayan hareket gözlenmiştir. Üçüncü gruptaki (TCP) 3 hayvanda füzyon segmentinde hiç hareket gözlenmezken 2 hayvanda bir miktar hareket gözlenmiştir. Dördüncü grupta ise (KNT+TCP) tüm hayvanların L4- L5 segmentinde hiç hareket gözlenmemiş olup tam olarak füzyonun gerçekleştiği kanaatine varılmıştır.

Manuel palpasyonla elde edilen bulgular **Tablo 7'** de gösterilmiştir.

Manuel değerlendirme sonucunda birinci ve ikinci gruplarda solid füzyon gelişmediği gözlendi. Üçüncü grupta solid füzyon oranı %60 (3/5) iken grup 4' de %100 (5/5) olarak saptandı. Bir puan alan bir miktar hareketin olduğu yarı solid füzyonlu numunelerde değerlendirmeye alındığında kontrol grubuna göre 2.,3. ve 4. gruplarda ve tüm gruplar arasında anlamlı derecede füzyon tespit edildi (**$p<0,01$**).

Rat No	Grup1 (sham)	Grup2 (KNT)	Grup 3 (TCP)	Grup 4 (TCP+KNT)
Rat 1	0	0	2	2
Rat 2	0	1	2	2
Rat 3	0	1	1	2
Rat 4	0	0	2	2
Rat 5	0	1	1	2

Tablo 7. Manual palpasyon ile elde edilen sonuçlar. (0: belirgin hareket var/ non-solid , 1: bir miktar hareket var , 2: hiç hareket yok/ solid)

Radyolojik Bulgular

Sekizinci haftadaki füzyon alanının radyografik sonuçları **Tablo 8' de** verilmiştir.

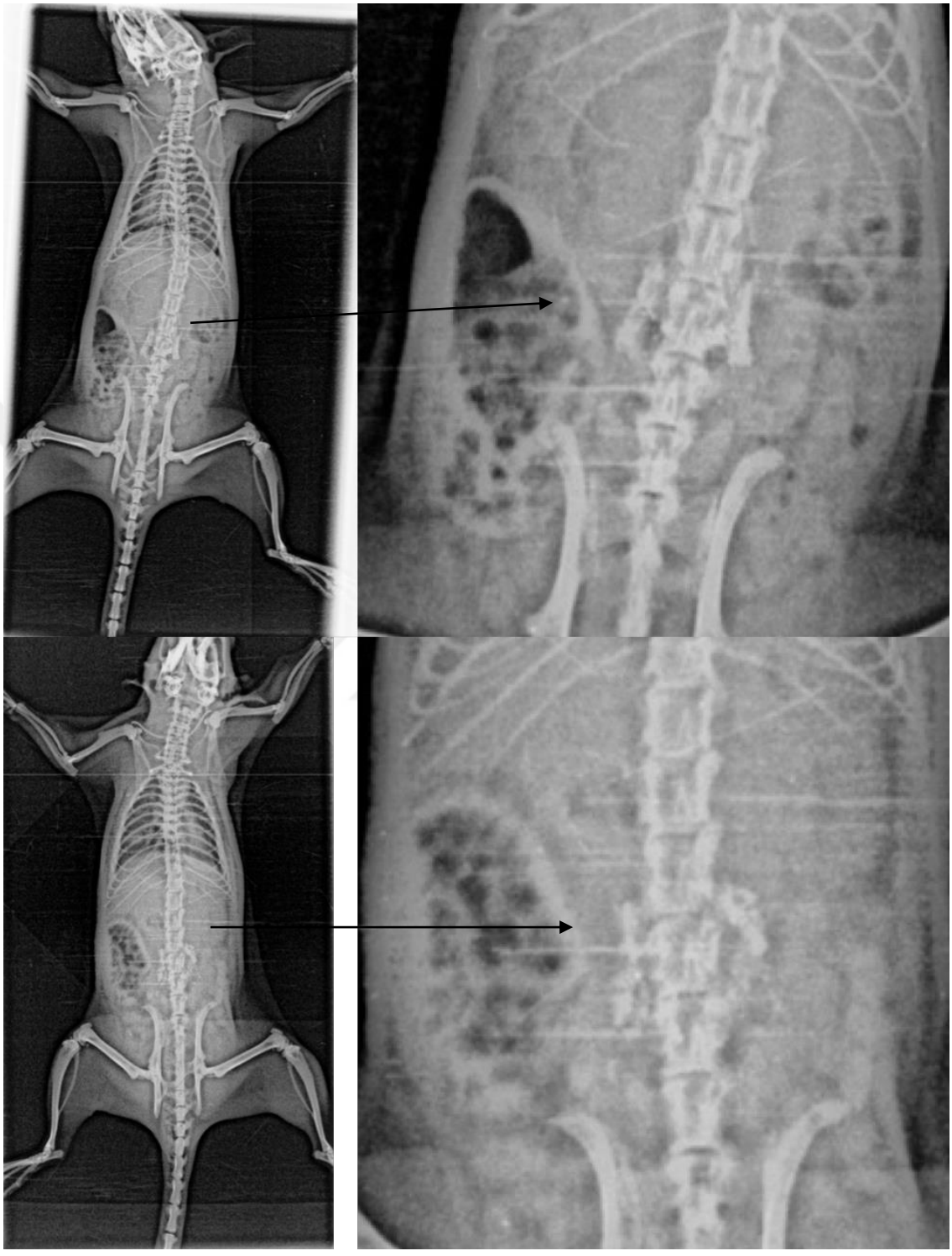
Rat No	Grup1 (8.hafta)	Grup2 (8. hafta)	Grup3 (8. hafta)	Grup 4 (8. hafta)
Rat 1	0	2	6	8
Rat 2	1	1	7	8
Rat 3	0	2	6	9
Rat 4	0	2	6	10
Rat 5	1	2	5	9

Tablo 8. Sekizinci haftadaki radyografi bulguları. (bilateral intertransvers proçes ölçümü sonrası 0- 10 puan arası skalaya göre ortalama)

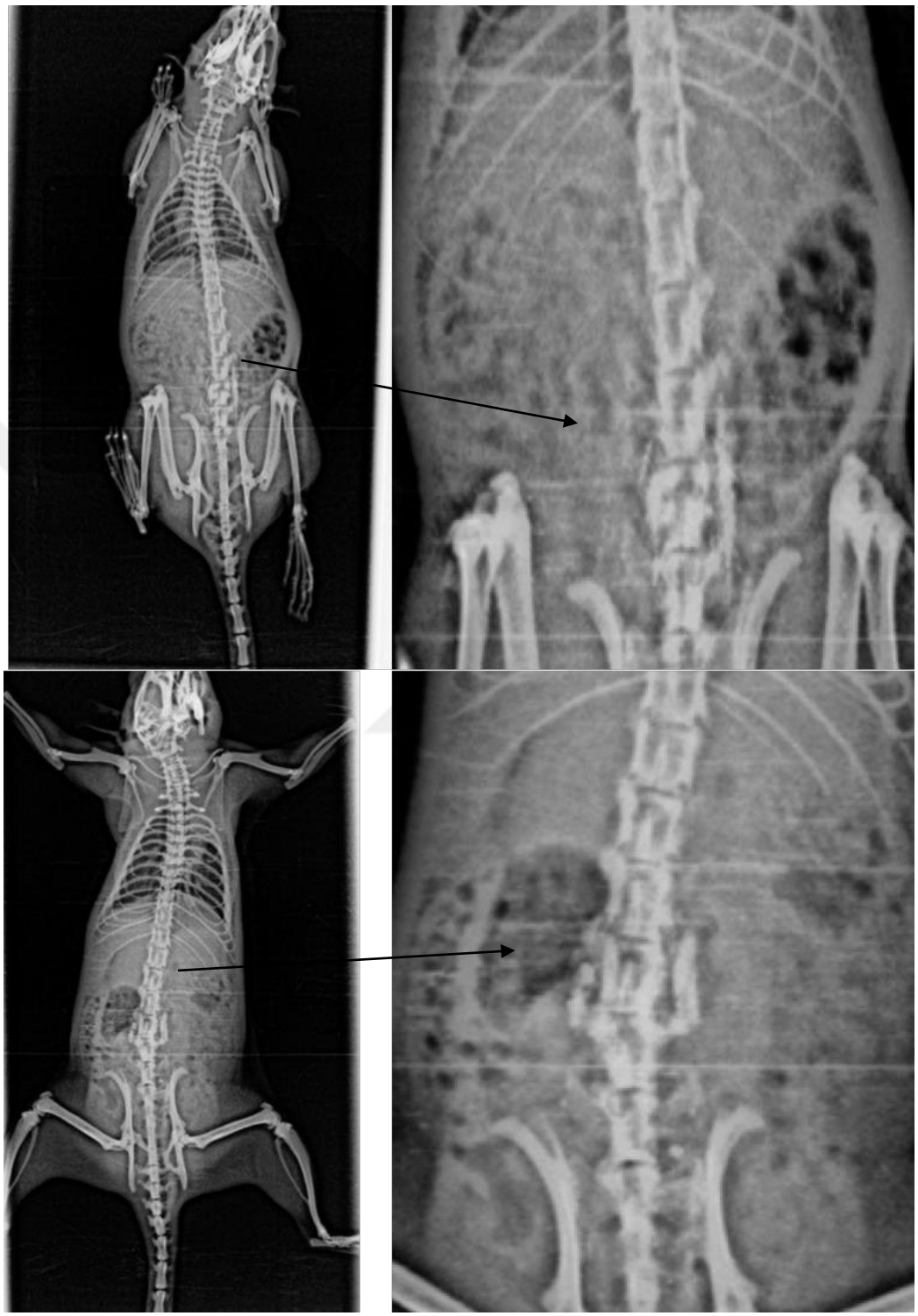
	0rtanca	Minimum	Maksimum	
Grup1 (n=5)	0	0	1	**P< 0,01**
Grup 2 (n=5)	2	1	2	
Grup 3 (n=5)	6	5	7	
Grup4 (n=5)	9	8	10	

Tablo 9. Radyolojik değerlerin Kruskal- Vallis analizi ile istatiksel olarak değerlendirilmesi. Tüm gruplar arasında füzyon oranları arasında anlamlı fark bulunmuştur **(p<0,01**).

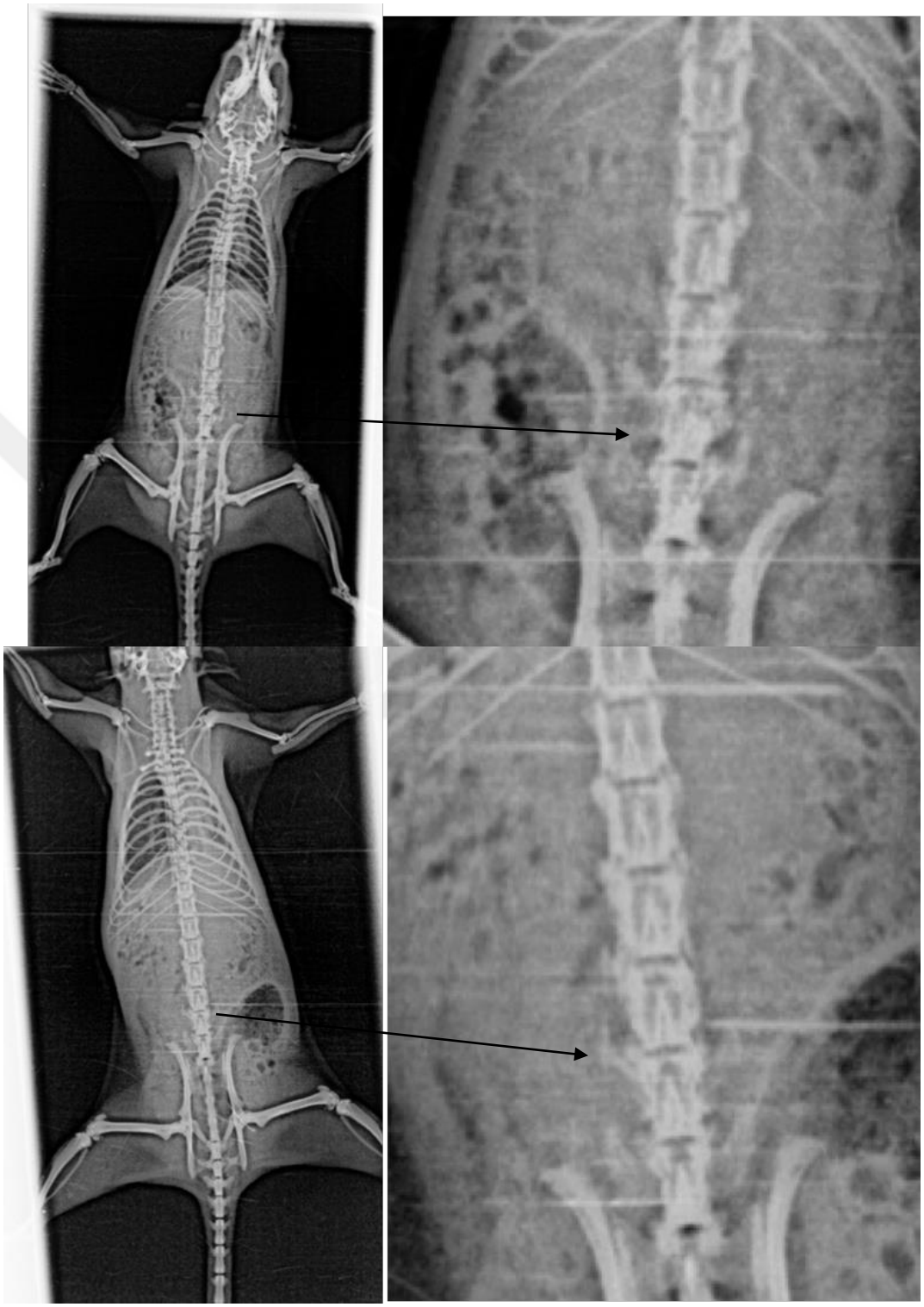
Radyolojik olarak kontrol grubunda füzyon saptanmadı. Grup 2' de %18, grup 3' de % 60, grup 4' de ise % 92 oranında füzyon olduğu gözlendi. İstatistiksel olarak tüm gruplar arasında anlamlı derecede füzyon oluştuğu tespit edildi (**Tablo 9**).



Şekil 14. Grup 4 den 2 deneğin 8. hafta sonrası x-ray görüntüleri.



Şekil 15. Grup 3 den 2 deneğin 8. hafta sonrası x-ray görüntüleri.

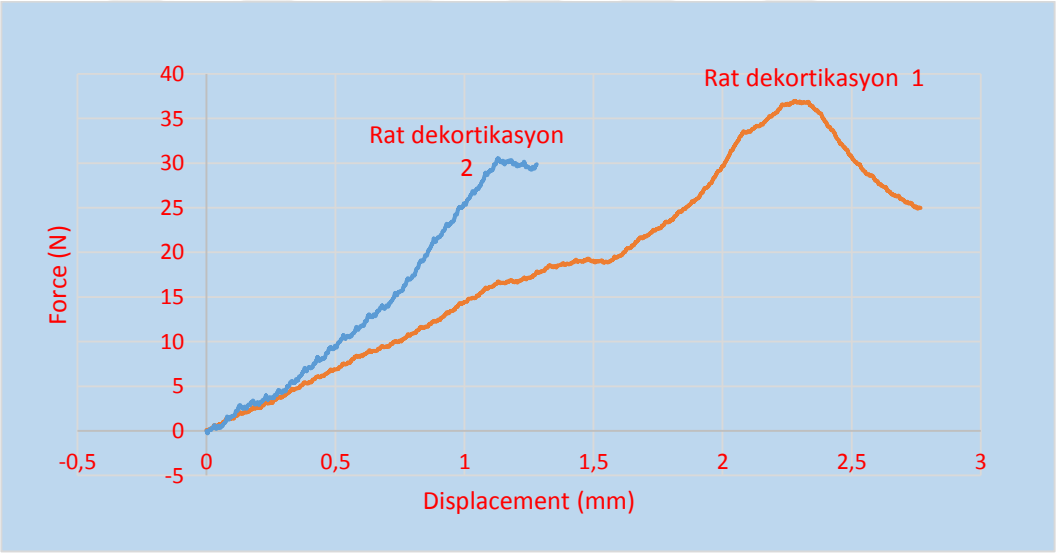


Şekil 16. Grup 2 den 2 deneğin 8. hafta sonrası x-ray görüntüleri.

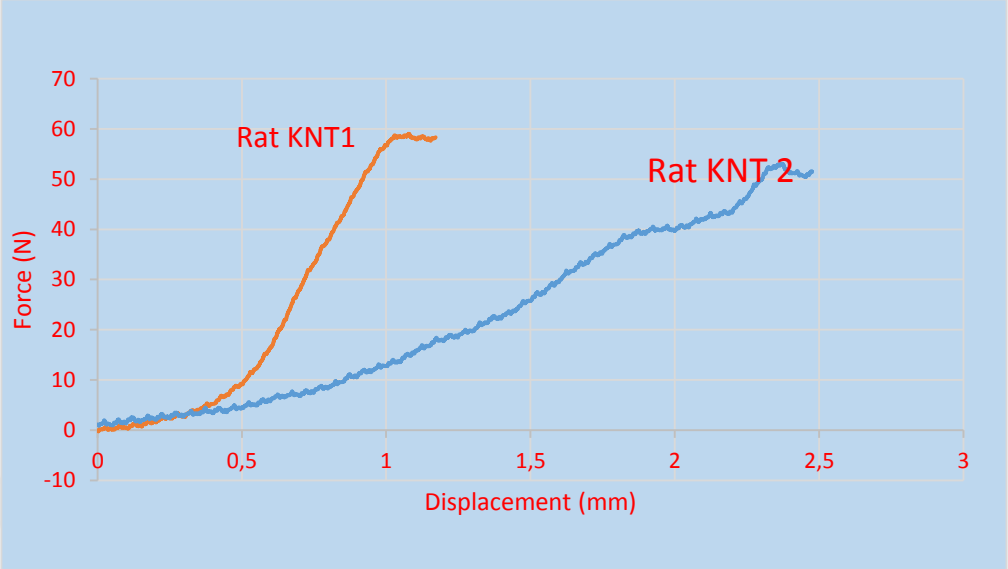
Biyomekanik Bulgular

Kontrol grubundaki iki deneğin üç nokta eğilme testindeki değerleri sırasıyla 30 N(Newton) ve 36 N' dur. Buna karşılık grup 2' de 59 N ve 53 N, grup 3' de 183 N VE 185 N, grup 4' de ise 218 N ve 236 N' luk değerler elde edilmiştir. Bu değerlere bakıldığında gruplar arasında belirgin farklar olmasına rağmen istatistiksel açıdan değerlendirilememiştir.

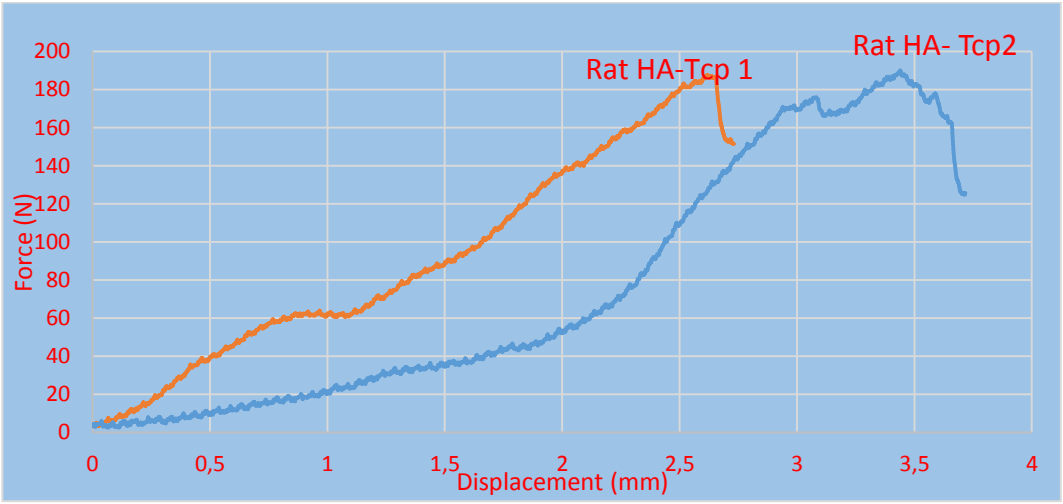
Tüm grupların yapılan biyomekanik incelmeleri **Şekil 17, Şekil 18, Şekil 19** ve **Şekil 20**' de grafiksel olarak gösterilmiştir.



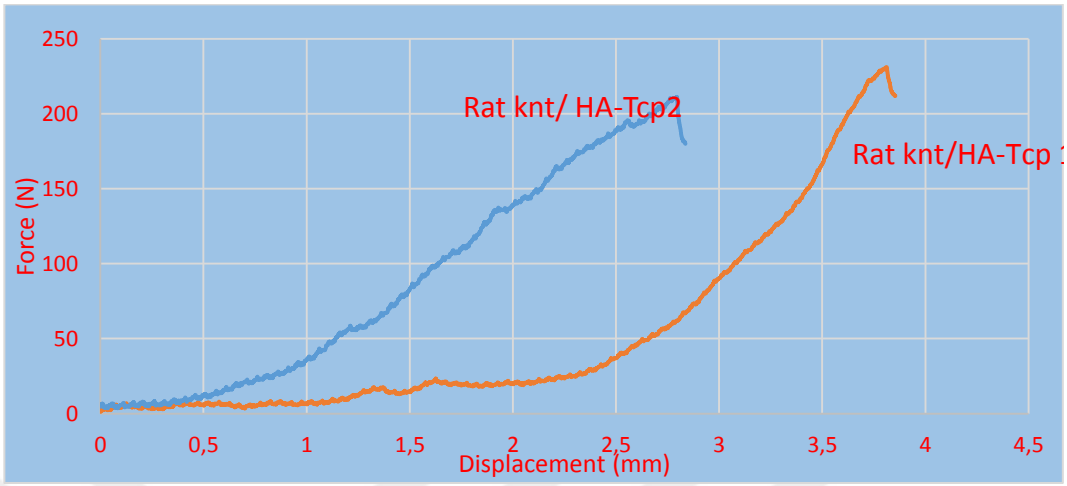
Şekil 17. Grup 1 deki (Dekortikasyon) 2 deneğin 3 nokta eğilme testi grafileri.



Şekil 18. Grup 2 deki (KNT) 2 deneğin 3 nokta eğilme testi grafisi.



Şekil 19. Grup 3 deki (HA-TCP) 2 deneğin 3 nokta eğilme testi grafisi.



Şekil 20. Grup 4 deki (KNT/HA-TCP) 2 deneğin 3 nokta eğilme testi grafisi.

Mikro-BT İncelemesi Sonrası Elde Edilen Veriler

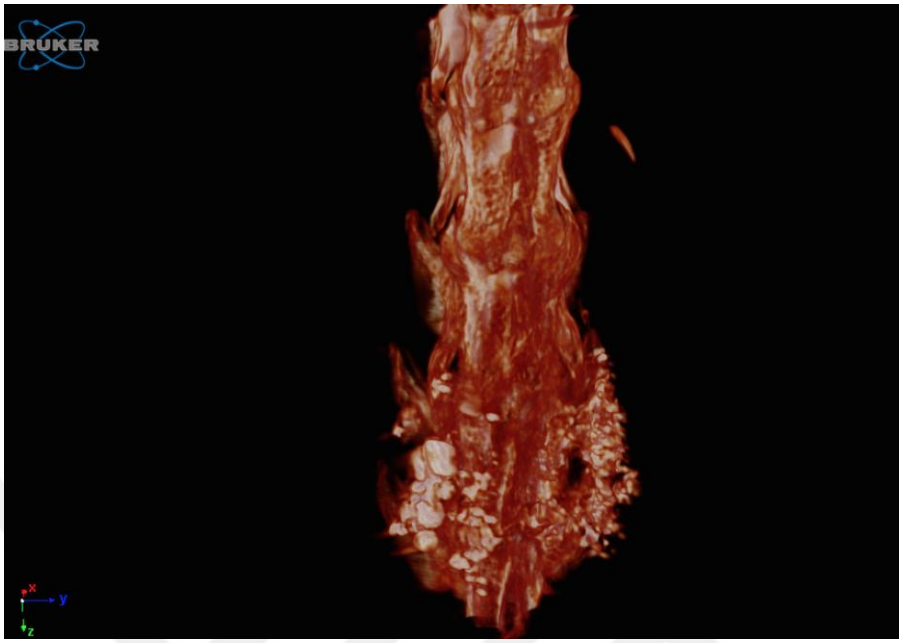
Rat no	**Grup 1**		**Grup 2**		**Grup 3**		**Grup 4**	
	Sağ	**Sol**	**Sağ**	**Sol**	**Sağ**	**Sol**	**Sağ**	**Sol**
1	0	0,1	1,1	2,5	20	18,9	39,7	27,6
2	0	0	1,8	0,7	6	24	37,6	33,7
3	0	0,1	0,2	3,9	18	20,1	28,5	35,6
4	0	0	0,4	1,4	14	20,7	28,8	29,3
5	0	0	0,2	0,4	28	18,2	34,8	36,2

Tablo 10. Mikro- BT incelemeleri sonrası Kemik Volüm (BV) / Doku Volüm (TV) değerlerinin sağ ve sol intertransversal füzyon alanı olarak değerleri.

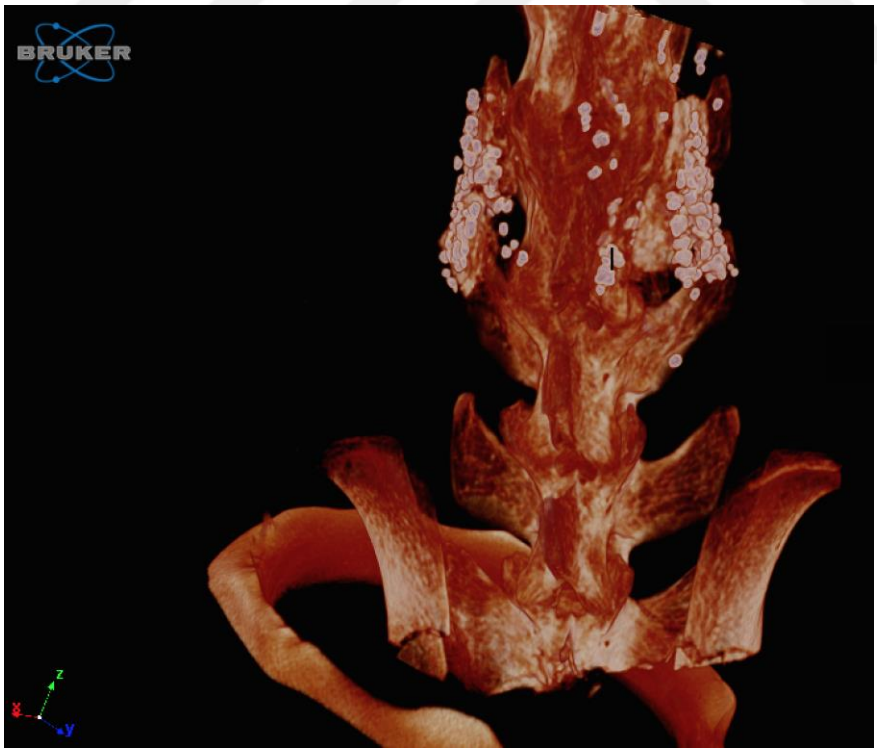
Mikro-BT incelemeleri sonunda BV/TV oranları grup 1, 2 , 3 ve 4' de sırasıyla %0, %1.3, %18.7, %33.1 olarak bulunmuştur. Veriler Kruskal – Vallis testi ile istatistiksel olarak değerlendirildiğinde tüm gruplar arasında spinal füzyon açısından anlamlı fark bulunmuştur (**Tablo 11**).

	0rtanca	**Minimum**	**Maksimum**	
Grup1 (n=10)	0	0	0,10	
Grup 2 (n=10)	0,9	0,2	3,9	
Grup 3 (n=10)	12	6	24	**P< 0,01**
Grup4 (n=10)	34,25	27,6	39,7	

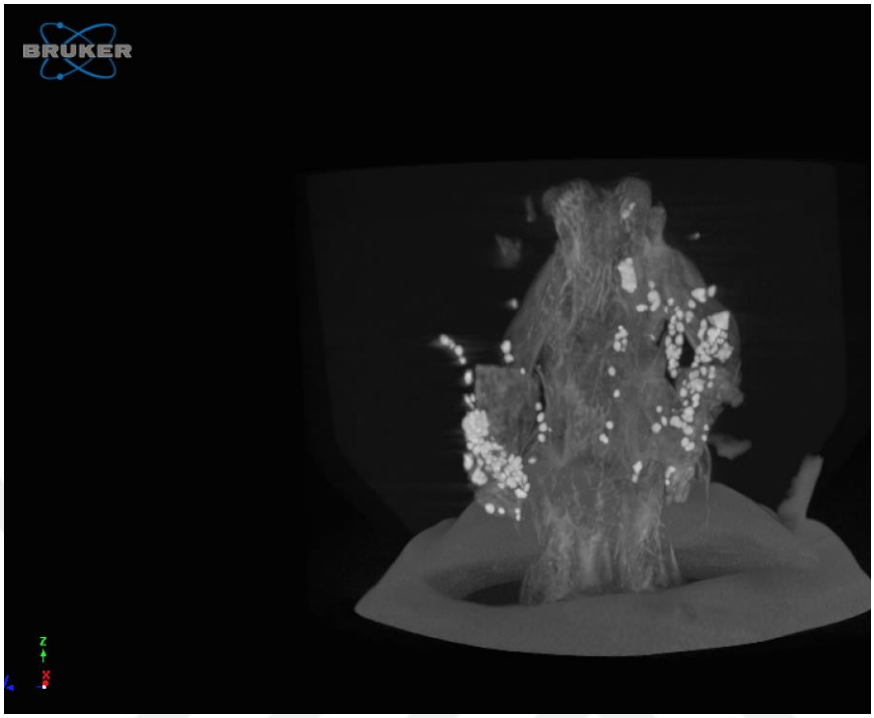
Tablo 11. Mikro- CT görüntülemeleri ile füzyon kitlesi kemik volümü/ doku volümü (BV/TV) oranlarının Kruskal- Vallis analizi ile istatiksel olarak değerlendirilmesi. Tüm gruplar arasında füzyon oranları arasında anlamlı fark bulunmuştur **(p<0,01).**



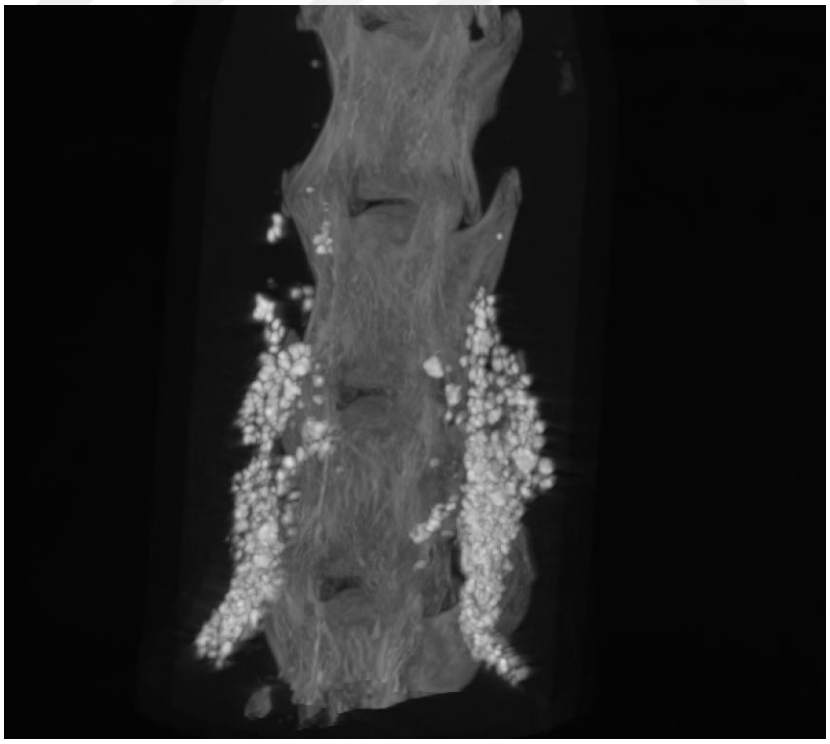
Şekil 21. Grup 4' deki (KNT/HA-TCP) bir deneğin füzyon alanının 3 boyutlu mikro-BT görüntüsü.



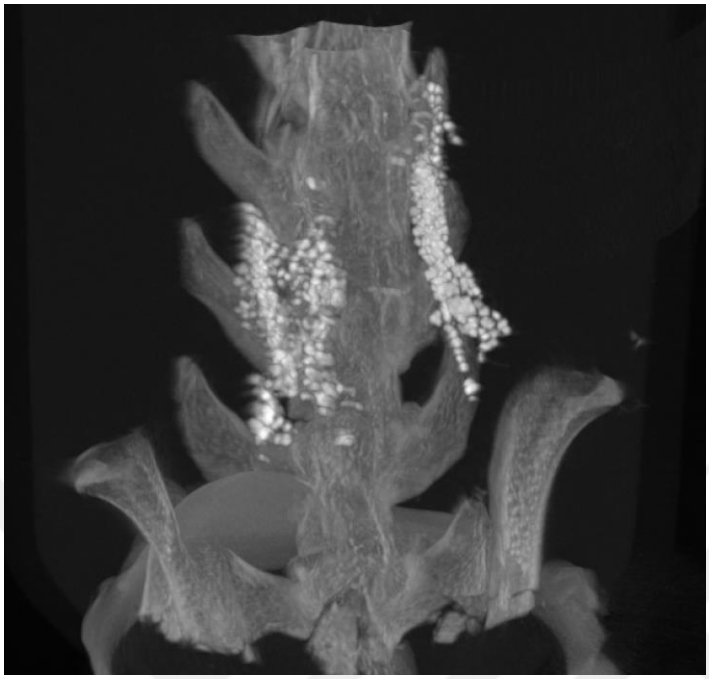
Şekil 22. Grup 4' deki (KNT/HA-TCP) bir deneğin füzyon alanının 3 boyutlu mikro-BT görüntüsü.



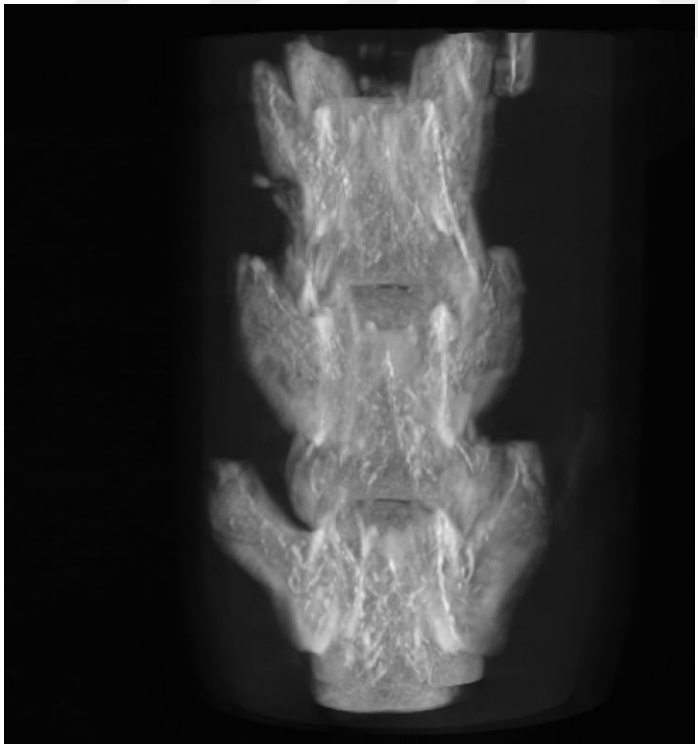
Şekil 23. Grup 4' den (KNT/HA-TCP) başka bir örnek.



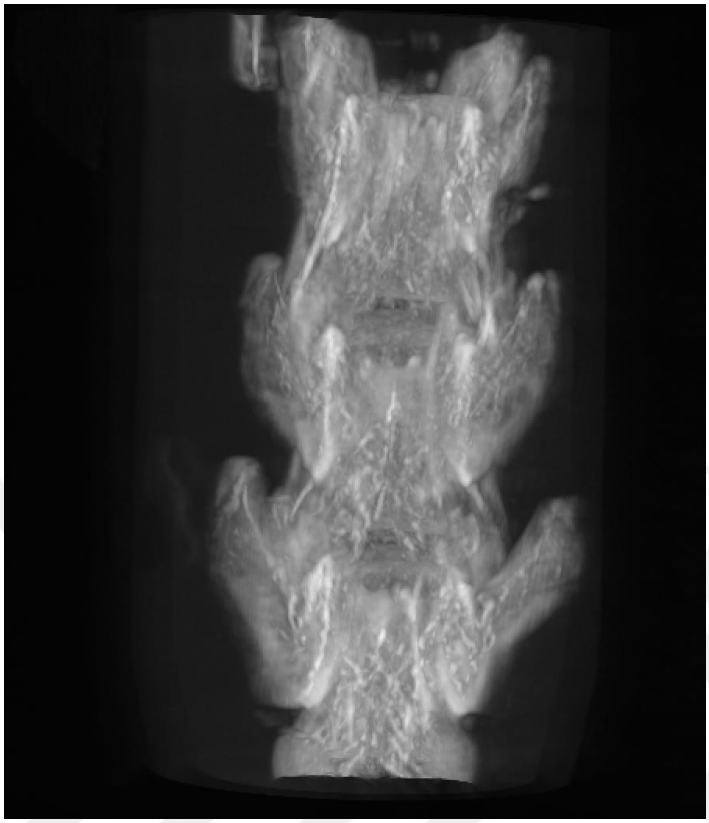
Şekil 24. Grup 3' den (HA-TCP) bir örnek.



Şekil 25. Grup 3' den (HA-TCP) bir örnek**.**



Şekil 26. Grup 2' den (KNT) bir örnek.



Şekil 27. Grup 2' den (KNT) bir örnek.

Histolojik Bulgular

Histolojik veriler Kruskal- Vallis varyans analizi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Buna göre tüm guruplar arasında histolojik olarak spinal açısından anlamlı fark bulunmuştur (**p<0,01**). İncelenen tüm kesitlere bakıldığında gruplar arasında histolojik farklar ilgili histoloji kesit görüntülerinin altında belirtilmiştir (**Şekil 28, Şekil 29, Şekil 30, Şekil 31**). Ayrıca Histolojik puanlamalar göz önüne alındığında grup 1, 2, 3 ve 4' de sırasıyla %0, %8, %42 ve % 68.5 füzyon oranları saptanmıştır.

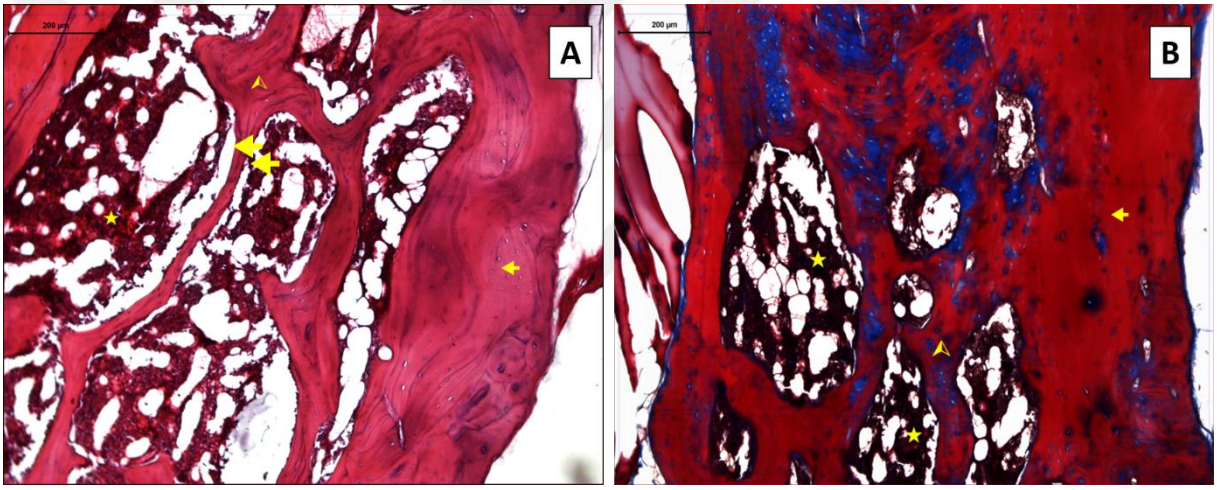
Kesit alanı	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
1	0	1	5	4
2	0	0	2	6
3	0	1	4	5
4	0	1	3	5
5	0	1	3	3
6	0	0	2	4
7	0	1	4	4
8	0	1	2	5
9	0	1	3	6
10	0	1	2	4

Tablo 12. Deneklerin histolojik değerlendirme ile elde edilen puanları.

	0rtanca	Minimum	Maksimum	
Grup1 (n=10)	0	0	0	
Grup 2 (n=10)	1	0	1	**P<0,01**
Grup 3 (n=10)	3	2	5	
Grup4 (n=10)	4,5	3	6	

Tablo 13. Füzyon kitlesi histolojik verilerinin Kruskal- Vallis analizi ile istatiksel olarak değerlendirilmesi. Tüm gruplar arasında füzyon oranları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,01$).

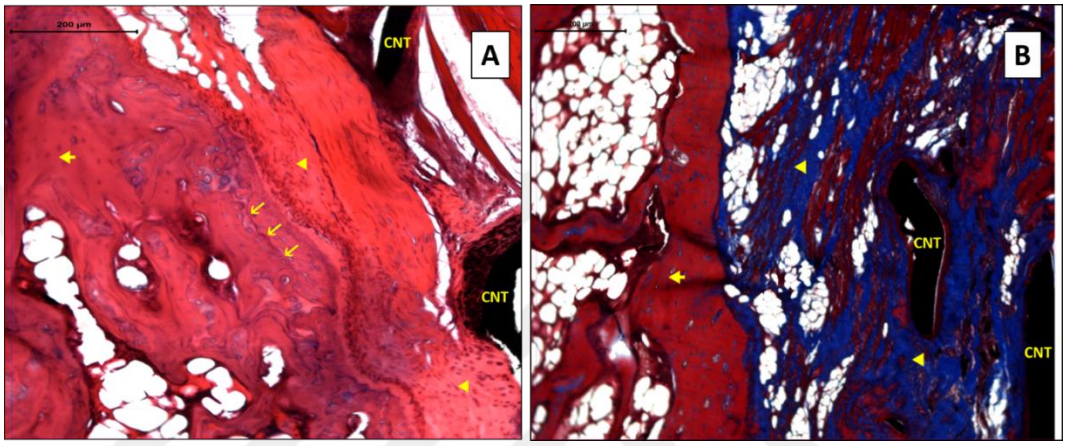
Birinci grupta rat dokularına ait, Hematoksilen- Eosin ve Masson - Trikrom ile boyanmış kesitlerde küçük ve büyük büyültmelerde; diğer gruplarda fusion yapılan bölgeye karşılık gelen alanda, aralarında kemik iliği bulunan, kemik trabeküllerinin birbirleriyle anastomozlaşarak bir ağ oluşturduğu görüldü. Ancak bağ dokusu, kıkırdak dokusu ya da kemik dokusu içeren yeni bir histolojik oluşuma rastlanmadı. (**Şekil 28 A,B.**)



Şekil 28. A,B. Sadece dekortikasyon yapılan gruba ait rat dokusunda, birbirleriyle anastomozlaşan, aralarında kemik iliğinin (★) bulunduğu kemik trabekülleri (⅄) izlenmekte, ancak kemik dokusu (host bone (🡐) dışında yeni bir dokunun oluşmadığı dikkati çekmektedir. (A: Hematoksilen-eozin x100, B: Masson Trikrom x100)

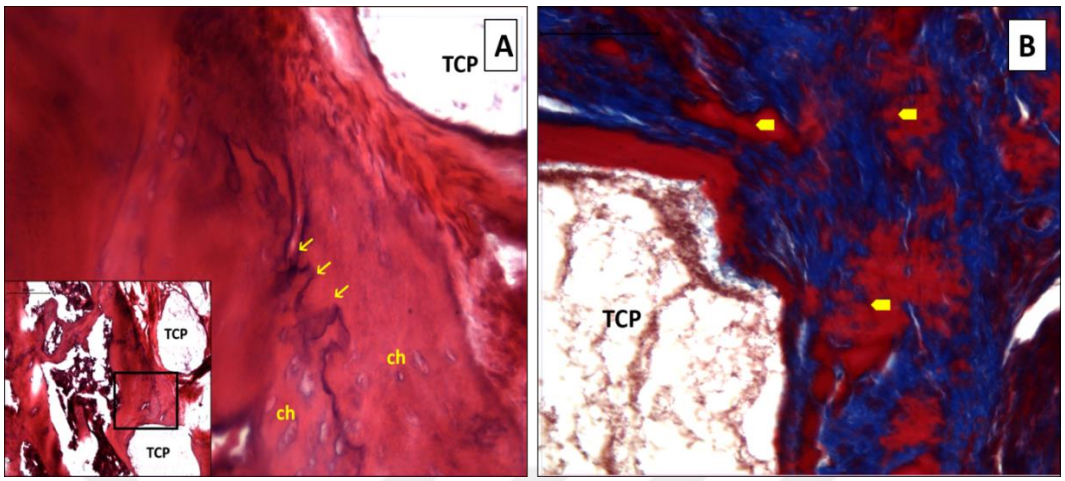
Postero-lateral füzyon uygulanmış, uygulama bölgesine KNT yerleştirilmiş (Grup 2) rat dokularının HE ile boyanmış kesitlerinde; uygulama bölgesinde KNT materyalini çevreleyen yer yer vaskülarize ve fibröz bağ dokusu proliferasyonu içeren alanlar gözlendi. Herhangi bir kıkırdak ya da kemik dokusunun varlığına rastlanmadı. (**Şekil 29 A.**) Aynı grubun Masson trikrom ile

boyanmış kesitlerinde de, KNT materyalinin çevresinde kollagen pozitif, fibröz bağ dokusu proliferasyonu izlendi. (**Şekil 29 B.**)



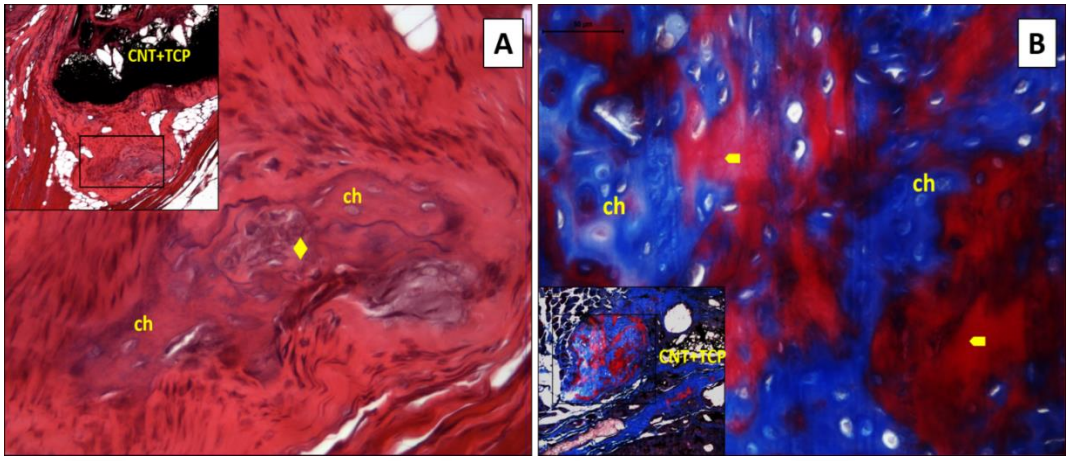
Şekil 29. A,B.: KNT yerleştirilmiş gruba ait rat dokusunda, KNT biomateryali (KNT) ile füzon alanında, kemik dokusu (host bone) (🡐) arasında, yoğun, fibröz bağ dokusu (◀), prolifere bağ dokusu ile kemik dokusu arasındaki demarkasyon hattı (←) gözlenmekte. (A: Hematoksilen-eozin x100, B: Masson Trikrom x100)

Postero-lateral füzyon uygulanmış ve uygulama bölgesine HA-TCP yerleştirilmiş rat dokularının (Grup 3) HE ile boyanmış kesitlerinde; füzyon alanında ve TCP materyalleri çevresinde prolifere bağ dokusu ve kondrositlerin net olarak ayırt edilebildiği ve aralarında demarkasyon hattının bulunduğu yeni organize olmaya başlamış kemik dokusu alanlarının varlığı gözlendi. (**Şekil 30 A.**) Aynı gruba ait Masson - Trikrom ile boyanmış kesitlerde ise TCP biomateryalini çevreleyen kollagen pozitif alanlar içinde yer yer yeni organize olmaya başlamış trabeküler özellikte kemik adacıklar izlendi (**Şekil 30 B.**).



Şekil 30. A,B) HA-TCP materyali çevresinde ve füzyon alanındaki prolifere bağ dokusu, kondrositleri (ch) içeren kondroid özellikteki, yeni organize olmaya başlamış trabeküler özellikte kemik dokusu ve prolifere bağ dokusu ile kemik dokusu arasındaki demarkasyon hattı (←) (A: Hematoksilen-eozin x400, B: Masson Trikrom x400)

Postero-lateral füzyon uygulanmış ve uygulama bölgesine KNT/ HA-TCP materyali yerleştirilmiş rat dokularının HE ile boyanmış kesitlerinde, füzyon alanında kompozit oluşumların çevresinde yoğun, prolifere bağ dokusu ve kondrositler içeren, kondroid özellik gösteren yeni doku oluşumu gözlenmektedir (**Şekil 31 A.**). Aynı gruba ait Masson trikrom ile boyanmış kesitlerde, kompozit materyal çevresindeki kollagen pozitif fibröz bağ doku içindeki kondrositleri içeren kondroid doku varlığı dikkati çekti. Ayrıca kondroid doku içerisinde birbirleriyle anastomozlaşan kemik trabeküllerinden oluşan yeni kemik dokusunun oluştuğu gözlendi (**Şekil 31 B**).



Şekil 31. A,B) Cnt+Tcp materyali (KNT/HA-TCP) çevresinde kıkırdak dokusu (♦) , kondrositler (ch) ve trabeküler özellikteki kemik dokusu (⬅) varlığı dikkati çekti. (A: Hematoksilen-eozin x400, B: Masson Trikrom x400)

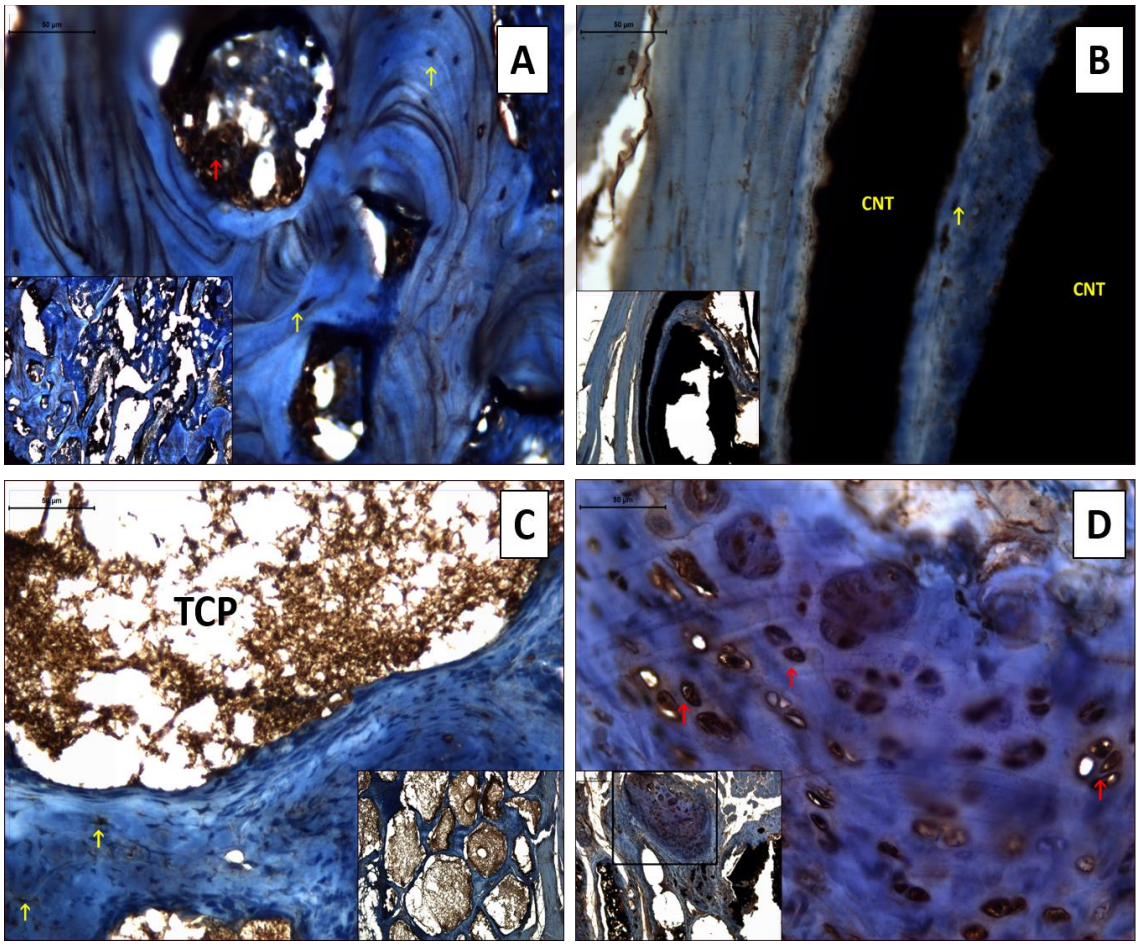
Sonuç olarak HA-TCP ve KNT/HA-TCP biomateryalleri uygulanan gruplar karşılaştırıldığında histolojik değerlendirme ve skorlama sonucunda her iki grupta da yeni kemik oluşumuna rastlandı, ancak KNT/HA-TCP grubunda yeni kemik dokusu oluşumu, histolojik skorlama açısından istatiksel olarak değerlendirildiğinde daha yüksek oranda kemik dokusu oluşumu dikkati çekti. Histolojik görünümler, yeni kemik dokusu oluşumunun enkondrol kemikleşme yolu ile olduğunu gösterdi.

İmmunohistokimyasal Bulgular :

Dekortikasyon grubunda (Grup 1), mevcut dokuda (host bone) , osteositlerde ve kemik iliği hücrelerinde (**Şekil 32 A**); KNT grubunda, proliferatif bağ dokudaki fibroblastlarda osteopontin immunreaktivitesi izlendi (**Şekil 32 B**). HA- TCP grubunda yeni oluşan proliferatif bağ dokudaki immunreaktivitenin

KNT grubuna göre daha kuvvetli olduğu görüldü (**Şekil 32 C**). KNT/HA-TCP grubunda ise fibroblastlarda, kondrositlerde, yeni kemik dokusu oluşumu içinde, diğer biomateryal uygulanan gruplara göre daha kuvvetli immunreaktivite izlendi (**Şekil 32 D**).

KNT- HA-TCP grubunda osteopontin immunreaktivitesinin daha kuvvetli olması, histolojik görüntüler ve skorlama sonuçlarını destekler niteliktedir.



Şekil 32. Sadece dekortikasyon (A), KNT (B), HA-TCP (C) ve KNT/HA-TCP grubuna (D) ait kesitlerde osteopontin immunreaktivitesi. Kemik dokuda, osteositlerde (os), kemik iliği hücrelerinde, proliferatif bağ dokudaki fibroblastlarda (sarı ok); biomateryalde (HA-TCP) ve kondrositlerde (kırmızı ok) yeni kemik dokusu oluşumu içinde osteopontin immün reaktivitesi izlendi. (DAB -Hematoksilen x400)

5. TARTIŞMA

Albee ve Hibbs tarafından 1900' lerin başlarında bildirilen ilk füzyon operasyonlarıyla beraber günümüzde bu girişim en sık kullanılan omurga cerrahisi uygulamalarından birisi haline gelmiştir. Spinal füzyon uygulamalarının halen tartışmalı olan en önemli yanlarından biri kayda değer oranda gözlenen nonunion veya psödoartroz oranlarıdır ve bu oran çeşitli çalışmalarda %5-35 arasında bildirilmiştir. Alıcıya ait metabolik faktörler, uygulanan füzyon alanındaki biyomekanik faktörler ve grefte ait faktörler (greft kaynağı, tipi, miktarı) spinal füzyon başarısını etkileyen başlıca konulardır (**8,32,72**).

Spinal füzyon prosedürlerininin füzyon oranlarının değerlendirilmesinde, bu sonuçlara etki eden her bir faktörü klinik olarak ayrı ayrı araştırmak zordur ve pratik de değildir. Bu yüzden spinal füzyonu ve spinal füzyonda kullanılan greft materyallerinin etkinliklerini değerlendirmede yaygın olarak hayvan spinal füzyon modelleri kullanılmaktadır. Literatürde rat , tavşan, köpek, domuz, keçi, koyun, maymun gibi farklı türlerle yapılmış spinal füzyon modelleri mevcuttur. En sık kullanılan hayvan türleri rat ve tavşandır. Rat modeli omurga füzyonunda kullanılabilecek en küçük hayvan modeli olup beslenmesi diğer hayvan modellerine göre daha kolay ve ekonomiktir. Ayrıca enfeksiyona dirençleri yüksek olup anestezi uygulamaları diğer hayvanlara göre daha kolaydır (**73,74**) .

Ratların kullanıldığı spinal füzyon modellerinde Sprague- Dawley cinsi tercih edilmektedir. Posterior spinal füzyon modellerinde sıklıkla kullanılan diğer

bir hayvan tavşandır. Özellikle omurga yapısının ratlardan daha büyük olması ve iliak kanat greftlerinin kullanılacağı deneylerde yeterli otogreft temin edilebilmesi nedeniyle tercih edilebilir. Tavşanların ratlar kadar dayanıklı olmamaları, cerrahi strese karşı daha hassas hayvanlar olmaları dezavantajları olarak belirtilebilir. Çalışmamızda spinal füzyon hayvan modeli olarak Sprague- Dawley cinsi ratlar tercih edilmiştir.

Spinal füzyon operasyonlarında greft kullanımının gerekliliği tartışmasız bir gerçek olup standart bir prosedür olarak kabul edilmektedir. Ishikawa ve arkadaşları yalnızca dekortike edilip enstrümantasyon uygulanan tavşanlarda füzyon oluşmadığını bildirmişlerdir (**75**). Aynı şekilde sıçanlarda ve köpeklerde uygulanan greftsiz füzyon çalışmalarında füzyon oluşmadığı gözlenmiştir (**76**). Greft kullanılmadan füzyon gerçekleştiğini bildiren birkaç sıçan ve köpek çalışması olsa da bu sonuçlar füzyon olayının ve greftin alıcıda izlediği seyrin türe göre farklılıklar gösterebileceği fikrini ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca bu deney hayvanlarının hızlı iyileşme potansiyelleri nedeniyle spontan füzyona yatkın oldukları düşünülmektedir. Ayrıca anatomik ve biyomekanik olarak farklı olan bu türler arasında füzyon oranlarının farklı olabilmesi aşikardır.

Çalışmamızda füzyon yatağında her hangi bir materyal kullanılmayan ve sadece dekortikasyon uygulanan grupta (**Grup 1**) manuel palpasyon, radyoloji, histoloji ve mikro-BT değerlendirmeleri ile ayrı ayrı incelendiğinde posterolateral

spinal füzyon oluşmadığı tespit edilmiştir. Bu bulgular ışığında herhangi bir spontan füzyon olgusuna rastlanmamıştır.

Otojen kemik greftleri (spinal füzyon için ilyak kanat otogrefti) osteojenik kapasiteleri en yüksek greft materyalleridir ve ideal özellikleri ile altın standart olarak kabul görmektedirler. İlyak kanat otogrefti, bulunabilirliği ve özünde füzyon geliştiren osteojenik, osteoindüktif ve osteokondüktif özellikleri nedeniyle kullanılmaktadır. Elde edilen otojen kemikte, osteoblastlar, kemik matrisi, BMP' ler ve TGF-β gibi faktörler bulunur. Ancak otogreft kullanılan hastalarda %30' lara varan oranlarda artmış kan kaybı, donör saha morbiditeleri, cerrahi sürede uzama gibi çeşitli komplikasyonlar izlenmektedir. Bu komplikasyonların yanında özellikle spinal deformite cerrahisi gibi uzun segment füzyon uygulaması gerektiren hastalarda yeterli miktarlarda otogreft elde edilememesi de önemli bir sorundur. Ayrıca bazı araştırıcılar implante edilen otogreftte TGF-β' nın rekombinant insan kemik morfogenetik proteininin (rhBMP) aksine nispeten küçük miktarlarda bulunması nedeniyle otogreftin osteoindüktif etkisinin aslında az olduğunu sorgulamaktadırlar (**77**).

Spinal füzyonda kullanılan otogreft elde edilme yerine göre : 1) ekstraspinal bölgeden (örneğin ilyak kanat otogrefti) elde edilen kemik grefti ve 2) spinal dekompresyon, dekortikasyon ve faset rezeksiyonu sırasında çıkarılmış kemik parçalar veya spinöz proçeslerden elde edilen greftler , ki bunlar genellikle lokal kemik grefti olarak adlandırılırlar. Lokal kemik greftinin ilyak kanat greftlerine

göre avantajı, ayrı bir cerrahi girişim gerektirmemesi; bu nedenle, cerrahi sürenin daha kısa tutulması ve kemik grefti hasatıyla ilgili komplikasyonların minimuma indirgenmesidir. Ancak lokal kemik otogreftleri özellikle geniş füzyon segmentleri için yeterli miktarlarda greft sağlayamazlar ve genellikle sentetik greft materyallari veya kemik genişleticilerle kombine edilirler. Tüm bu nedenlerden dolayı spinal füzyonda birçok allogreft, ksenogreft, sentetik seramik bazlı greftler, osteopromotif ajanlar ve biyolojik materyaller kullanılmış ve bunların spinal füzyondaki etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Lokal otogreftler, seramik bir genişleticiye eşlik etmek için ideal bir yardımcıdır. Lokal otogreftler sıklıkla füzyon çalışmalarında kullanılmış ve yüksek füzyon oranları elde edilmiştir, ayrıca aynı insizyonla aynı cerrahi prosedür içinde elde edilmesi büyük bir avantajdır. Posterolateral füzyonda lokal otogreft yüksek füzyon oranlarına neden olsa da, çoğu kez greft hacmi yetersiz kalabilmektedir.

Bu olgularda, başarı olasılığını artırmak için sentetik seramikler başta olmak üzere kemik genişleticiler önerilmektedir (**78,79**). Çalışmamızda spinöz proçes, dekortikasyon materyali gibi herhangi bir lokal greft kullanılmamıştır.

Seramikler, istenilen miktarda bulunabilmeleri, üretimlerinin nispeten ucuz olması ve hastalık bulaşma riski taşımamaları gibi nedenlerden dolayı spinal füzyonda giderek kullanımları artan osteokondüktif materyallerdir. Seramikler, diğer füzyonu artırıcı materyaller ile karşılaştırıldığında birçok avantaj sağlarlar.

Biyolojik olarak inerttirler ve genelde bir konak inflamatuar cevabına yol açmazlar. Buna ek olarak seramikler yapısal bütünlüğünü kaybetmeden sterilize

edilebilirler, böylece hastalık bulaşma riski en aza indirilir. Ayrıca, posterolateral ve lumbar füzyonlarda olduğu gibi farklı ortamları uygun bir şekilde eşleştirmek için seramikler çeşitli şekillerde kesilebilir ve kalıplanabilirler (**8,80,81**). Son olarak, seramiklerin maliyeti, geleneksel olarak, büyüme faktörleri gibi diğer kemik grefti ürünlerine kıyasla daha düşüktür. Bu sentetik materyallerin gözeneklilik oranı ve gözenek boyutları kemik içi büyüme için optimize edilmiş olacak şekilde tasarlanmıştır. Seramik skafoldlar, kemiğin mineral fazını taklit ederek üretilirler ve gözenekli formlar halinde mevcuttur. Porozite , mezenkimal hücre adezyonuna, proliferasyona ve olgun osteoblastlara farklılaşmaya izin verir. Bir seramiğin porozitesi ne kadar fazla olursa, mekanik mukavemeti o kadar çok azalır ve rezorpsiyon hızı da o derece artar. Arayüz aktivitesini, kemik büyümesini ve biyolojik bozunmayı arttırmak için 150 ila 500 μm arasında optimum gözenek boyutu bildirilmiştir (**80,82**).

Seramik bazlı greftler, düşük kırılma direnci ve gerilme mukavemeti ile doğal olarak kırılgan olduklarından, ortopedi uygulamalarında enstrümantasyonlu füzyon gibi internal fiksasyon cihazlarıyla birlikte kullanılırlar ve bu da konakçı kemik füzyonu oluşana kadar füzyon sahasına binen kuvvetlerden korur (**81**). Çok sayıda seramik bazlı preparat ticari olarak mevcuttur ve bu materyallerin omurga füzyon prosedürleri için uygun ve kullanışlı olduğunu bildiren in vivo çalışmalar mevcuttur. Bir gruba ilyak kemik otogrefti, diğer gruba β-TCP ve lokal otogreft uygulanan, tek seviyede enstrümantasyonlu posterolateral lomber omurga füzyonu uygulanan 62 hastanın randomize kontrollü bir çalışmasında, her iki gruptaki

hastaların tamamında postoperatif 3 yıllık radyografik kriterlere dayanarak kemik füzyonu sağlanmıştır (**83**). Bu veriler, Epstein' in daha önce yayınlamış bir vaka serisinin bulgularını desteklemektedir; burada, lokal otogreft ve β-TCP ile yapılan iki seviyeli enstrümantal posterolateral füzyon oranları bilgisayarlı tomografi ile incelenmiş ve 6. ayda otogreft ve β-TCP gruplarında sırasıyla % 96 ve % 85 'lik füzyon oranları gözlenmiştir (**84**). Yine posterior enstrümantasyonlu lomber spinal füzyon ile tedavi edilen semptomatik dejeneratif lomber spinal stenozlu 60 hastanın prospektif, randomize bir çalışmasında bir grupta ilyak kanat otogrefti ,bir gruba hidroksiapatit preparatı uygulanmış ve her ikisinde de postoperatif 1 yıllık takipte tüm gruplarda % 100 füzyon oranı bildirilmiştir (**85**).

Bu çalışmaların aksine TCP ve HA nin aslında tek başlarına kullanıldıklarında spinal füzyon oranlarında belirgin düşmeye yol açtığını bildiren çok sayıda çalışma mevcuttur. Kenneth ve arkadaşlarının köpeklerde yaptğı bir çalışmada TCP, HA seramikler ve kollojen hem tek başlarına, hem de herbiri kemik iliği aspiratı ile birlikte kullanılmıştır. Buna göre kemik iliği aspiratı ile muamele edilmiş TCP ve HA greftlerin 12. ve 24. haftalarda otojen kansellöz kemik gibi davrandığını, ancak tek başına TCP veya HA greftlerin ise kaynama ve füzyon için uygun olmadığını rapor etmişlerdir (86). Yine Ragni ne arkadaşları da HA ile DBM karışımının otojen greft ile benzer sonuçlarda olduğunu , sadece HA kullanıldığında füzyon oranlarının düştüğünü bildirmişlerdir (**87**).

Bu çalışmada greft materyali olarak HA/ TCP- beta kullanılan grupta (grup 3) füzyon oranları tatmin edici bulunmuş fakat mutlaka bir destekleyici materyalle (lokal otogreft, osteoindüktif , osteojenik veya osteopromotor ajanlar, KNT'ler … gibi) kullanımlarının füzyon oranlarını daha da artıracağı öngörüsünde bulunulmuştur. Seramik HA- TCP greft materyalinin kullanıldığı grup 3' de füzyon oranları manuel palpasyonla %60, radyolojik olarak %60, histolojik olarak %42 olarak bulunmuştur. Mikro- BT incelemeleri ile BV/ TV oranları grup 3 ve grup 4' de sırasıyla %18.7 ve % 33.1' dir. Sadece sentetik greft kullanılan grupla kompozit grup arasında füzyon oranları açısından histolojik, radyolojik ve mikro-BT değerlendirmeleri ile anlamlı fark bulunmuştur (**$p<0.05$**). Biyomekanik değerlendirme için yapılan üç nokta eğilme testinde ise grup 3' deki değerlerin (183 ve 185 N) grup 4 değerlerinden (218 ve 236 N) belirgin düşük olduğu saptanması seramiklere eklenen KNT nin füzyonu güçlendirdiğini düşündürmüştür.

Seramik bazlı sentetik greftlerin omurga füzyonu göz önüne alındığında rezorpsiyon hızları çok kritiktir: kalsiyum sülfat implantasyon sonrası birkaç haftada rezorbe olurken, β-trikalsiyum fosfat (β-TCP) birkaç ayda emilir, hidroksiapatit (HA) ise yıllar sonra absorbe edilir . Kalsiyum sülfatın çabuk rezorbe olması omurga ameliyatlarında kullanımını sınırlandırmıştır, bunun yerine β-TCP ve HA ikilisinin kombine edildiği preperatlar spinal füzyon cerrahisinde yaygınlaşmıştır. β-TCP' ın HA' e göre daha çözünür olması nedeniyle bu çift fazlı (bifazik) iki farklı seramik bileşim kombine edilerek kemik hücrelerinin

fizyolojisiyle uyumlu ideal bir rezorpsiyon hızı elde edilmiştir. Seramikler güvenilir bir osteokonduktif matriks sağlarlarken genel olarak osteoindüktif potansiyelden yoksundur. Sonuç olarak, lokal otogreft veya kemik iliği aspiratı gibi bir hücre kaynağı ile başarılı bir şekilde artrodez oranı esasen daha yüksektir. Seramikler biyolojik olarak parçalanabilir ancak bu rezorbsiyon ve yeniden modelleme, normal kemik yeniden modellemesinden (remodelling) farklı bir süreçle gerçekleşir. Malzeme, osteoklastlar yerine yabancı cisim dev hücreleri vasıtasıyla emilir ve tam rezorpsiyonun 10 yıla kadar sürebileceğini gösteren çalışmalar bildirilmiştir (**88**).

Spinal füzyonda kullanılan seramiklerin füzyon oranlarını, osteointegrasyonunu ve biyomekanik özelliklerini iyileştirmek için çalışmalar halen devam etmektedir. Aslında kırılgan hidroksiapatit seramik matriksin biyouyumluluğundan ödün vermeden mekanik özelliklerini geliştirmek için HA ile çinko, magnezyum, gümüş, zirkonya, alümina ve titanyum gibi maddeler kaplama ve skafold amaçlı birlikte kullanılmıştır (**89**).

Son yıllarda gelişen karbon nanotüplerin de özellikle kemik doku mühendisliğinin geliştirilmesine yönelik çeşitli çalışmalarda kullanıldığını görmekteyiz. Karbon nanotüpler, iyi mekanik özelliklerinin yanısıra yüksek gerilme mukavemeti, yüksek esneklik ve diğer eşsiz yapısal ve fizikokimyasal özellikleri nedeniyle günümüzde önemli bir ilgi görmektedir. Karbon nanotüplerin 0,5-2 nm çapları, 0,2-0,7 g / cm^3 yoğunluğu ve 10^3- 10^4 en-boy oranı gibi

benzersiz yapısal boyutları takviye edici bir ajan olarak mükemmel etkinliğine neden olur. Buna ek olarak yapılarında çok güçlü bağlar olduğu için KNT' ler bilinen kimyasal çözücülerle dağılmazlar, yani inerttirler. Çalışmamızda spinal füzyon prosedürlerinde sık olarak kullanılmakta olan seramik bazlı sentetik greftlerin çok duvarlı karbon nanotüpler (ÇDKNT) ile kompoziti oluşturulmuş ve ÇDKNT' lerin füzyona olan etkileri (muhtemel osteokondüktif ve greft tutucu destek etkileri) ve seramik bazlı sentetik greftlerle birlikte olan etkileşimleri incelenmiştir.

KNT' ler, hidroksiapatitin mukavemetini ve tokluğunu artırmak için bir takviye malzemesi olarak çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır. 2015 yılında Mukheriee ve arkadaşları güçlü bir hidroksiapatit esaslı implant materyali geliştirmek için farklı KNT miktarlarını kullanarak HA/KNT biyokompoziti oluşturup in vitro ortamda fiziksel, mekanik ve ayrıca tavşanlarda in-vivo etkilerini incelemişlerdir (**90**). Bu çalışmada KNT' lerin konsantrasyonlarındaki artışın hidroksiapatinin mekanik mukavemetinin belirgin olarak arttığını ve KNT' lerin en yoğun kullanıldığı %5' lik en yüksek konsantrasyonlarda bile hemoliz oranlarında belirgin artışın gözlenmediği bildirilmiştir. Bu sonuçlara göre işlenmiş formdaki KNT' lerin belli dozun üzerine çıkılmadığında sitotoksik olmadıklarını belirtmişlerdir. Çalışmamızda kullanılan KNT materyalinin oranı %3.2 (20 mg) olup KNT kullanılan gruplarda histolojik olarak herhangi bir hücre nekrozuna ait bulguya rastlanmamıştır.

Birçok çalışma, kemik dokusunun yenilenmesi için takviye edici skafoldları oluşturma potansiyelini tartışmak için, karbon nanotüplerin (KNT) mekanik ve kimyasal özelliklerini ele almakta ve ayrıca biyolojik uyumluluğunu da değerlendirmektedir. 1-2 Bu fikir yaklaşık on yıl önce ortaya çıkmış ve KNT'lerin hidroksilapatit gibi materyallerle kullanılabilirliliği kanıtlanmıştır. O zamandan beri, kemik doku mühendisliği ile uğraşan çoğu araştırmacı şu temel sorunun cevabını aramaktadır: "Yapay kemik materyali veya kemik greftleri kompozisyon açısından nasıl daha iyi geliştirilebilir ve bu yapılırken mekanik güç ve canlı fonksiyonlar gibi özellikler nasıl daha iyiye götürülebilir ? " (**91,92**).

Çalışmamızda HA ve TCP-beta içeren seramik greftler ÇDKNT' ler ile desteklenmiş ve füzyon oranlarında anlamlı oranlarda iyileşme sağlandığı görülmüştür. Bu olumlu etki KNT' lerin tek başına kullanıldığı grupta da sağlanmasına rağmen esasen kemik oluşumu için tek başına yeterli olabileceği görüşünden çok özellikle seramik bazlı greftlerle beraber kullanıldığında iyi bir destek yapı iskelesi formu sağladığı görüşünü desteklemektedir. Bizim çalışmamızda da ortaya çıkan sonuçlara göre KNT' lerin seramiklerle birlikte kullanıldığında füzyona yardımcı iyi bir destek sağladıklarını göstermektedir. Aynı zamanda KNT' lerin greft tutucu etkiye de sahip oldukları ve bu sayede konakçı ile greft materyali arasında kolaylaştırıcı bir arayüz görevi gördükleri düşünülmüştür.

Biyolojik uyumluluğunun yanında KNT' lerin kemik dokusunun remodelizasyonuna yönelik takviye edici skafold potansiyelini araştırmaya yönelik yapılan bir biyomekanik çalışmada, KNT ler normal kemiğe göre daha sert ve kuvvetli bir davranışa sahip olduklarından kemik "remodelling" sürecinde gerekli olan mekanik uyaranların eşik değerlerini yükselttiği ve bunun da remodelizasyonu olumsuz şekilde değiştirebileceği bildirilmiştir (**93**).

Mikro bilgisayarlı tomografi incelemeleri hayvan modellerinde oluşturulan posterolateral spinal füzyonun değerlendirilmesinde kantitatif olarak ölçülebilen en güvenilir yöntemlerden biridir. Burada trasvers proçesler arasındaki bölge işaretlenerek toplam ölçülen doku (tissue volume- TV) ve bu doku içindeki kemik hacmi (bone volüme- BV) milimetreküp cinsinden ölçülür. Her örnekteki toplam incelenen dokuyu eşitlemek imkansız olduğundan ölçümlerde BV/TV oranının kullanılması en güvenilir sonuçları verir (**94,95**).

Çalışmamızda mikro-BT incelemeleri sonunda BV/TV oranları grup 1, 2 , 3 ve 4' de sırasıyla %0, %1.3, %18.7, %33.1 olarak bulunmuştur. Veriler Kruskal – Vallis testi ile istatistiksel olarak değerlendirildiğinde tüm gruplar arasında spinal füzyon açısından anlamlı fark bulunmuştur.

Kuadripedal kemirgenlerle spinal füzyon modelinin güncel sonuçları, biyomekanik ve ajanlara biyolojik reaksiyon farklılıkları nedeniyle insanlarda yapılan omurga artrodezine doğrudan korele etmek doğru değildir. Özellikle füzyonun biyomekanik olarak değerlendirilmesinde bu biyomekanik sonuçların

ayakta durabilen ve anormal yükler taşıyabilen insana uyarlanması oldukça zor görülmektedir. Bununla birlikte rat omurgasının insan omurgasına anatomik ve morfolojik olarak çok benzer olduğu bildirilmiştir ve ideal hayvan modellerinden biridir (**96,97**).

Çalışmamızda her gruptan sadece ikişer hayvana biyomekanik test yapılabilmiş ve biyomekanik olarak istatistiksel analiz yapılamamıştır. Yine in-vitro ortamda oluşturulan materyalin membran şeklinde elde edilmesi diğer bir kısıtlılık olarak gösterilebilir. Özellikle üç boyutlu yazıcı teknolojisinin yaygınlaşması ve gelişmesi ile karbon nanotüp içerikli seramik kompozitlerin üç boyutlu olarak geliştirilebileceği ve spinal füzyona olan olumlu etkilerinin daha çok artacağı inancındayız.

6. SONUÇLAR

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçları literatür bilgileri ile sentezlediğimizde aşağıdaki çıkarımlara ulaşabiliriz.

- Spinal füzyonda herhangi bir greft materyali kullanılmadan sadece dekortikasyon işlemi yeterli olmamaktadır. Literatürde greft kullanımı standart olarak kabul edilmektedir. Çalışmamızda da sadece dekortikasyon uygulanan grupta herhangi bir füzyon saptanmamıştır. Literatürde sadece birkaç çalışmada deney hayvanlarında spontan füzyon bildirilmiştir. Bu olay cerrahi işlemin nasıl yapıldığına, cerrahi ekspojura ve hayvanın kendi tür özelliklerine bağlanabilir.
- Seramik bazlı otogreftler spinal füzyon oluşumunda etkilidirler ancak bu greftlerin sinerjistik olarak bir destekleyici materyalle (lokal otogreft, osteoindüktif, osteojenik veya osteopromotor ajanlar,KNT' ler … gibi) birlikte kullanımları daha avantajlıdır.
- KNT' lerin spinal füzyonda tek başlarına kullanımı ile oluşan füzyon oranları çok düşük kalmaktadır.
- KNT' ler tek başlarına kullanıldığında spinal füzyon oluşturmada yetersiz kalsa da özellikle yüksek biyouyumlulukları ve kemik dokusuyla uyumlu eşşiz biyomekanik özellikleri nedeniyle özellikle seramik bazlı sentetik greftlerle birlikte füzyon oranlarını anlamlı olarak yükseltmektedirler.

- Mikro- BT incelemelerinde spinal füzyon oranlarını değerlendirmede özellikle kemik volümü (bone volüme) (BV) / doku volümü (tissue volüme) (TV) yüzdelerinin kullanılması objektif parametrelerden biridir.
- Spinal füzyonun değerlendirilmesinde her bir faktörü klinik olarak ayrı ayrı araştırmak güç olduğundan yaygın şekilde klinik öncesi hayvan modellerinin kullanılması güncelliğini devam ettirmektedir.

7. ÖZET (Türkçe ve İngilizce)

Giriş: Posterolateral spinal füzyon uygulamalarında greftleme standart olarak uygulanan prosedürlerden biridir. Otojen greftler ideal greft özelliklerine sahip olmalarına rağmen ortaya çıkardıkları komorbiditeler nedeniyle çok çeşitli greft materyalleri üzerinde çalışmalar sürdürülmektedir. Günümüzde seramik bazlı sentetik greftlerin spinal füzyon operasyonlarında kullanımları yaygın olmakla birlikte etkinliklerini artırmak için çeşitli materyallerle birlikte kombine edilerek spinal füzyona olan etkileri incelenmektedir. Karbon nanotüplerin (KNT) hidroksiapatit (HA) gibi seramiklerle kullanımı yeni olup kemik doku mühendisliğinde olumlu gelişmelere neden olmuştur. Çalışmamızda daha önce spinal füzyonda greft materyali olarak kullanılmayan KNT destekli HA-trikalsiyum fosfat (TCP) materyalinin spinal füzyon üzerine etkileri incelenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda 20 adet Spraque- Dawley cinsi rat kullanılarak lomber 4-5 (L4-L5) vertebralar arasına posterolateral füzyon modeli oluşturulmuştur. Denekler 5' erli dört gruba ayrılmıştır. Tüm deneklerin L4-L5 posterior arklarına dekortikasyon uygulanmış, birinci gruba herhangi bir greft materyali uygulanmamış, ikinci gruba sadece KNT, üçüncü gruba HA-TCP sentetik seramik ve dördüncü gruba ise KNT/ HA-TCP kompoziti uygulanmıştır. Sekiz hafta sonunda tüm hayvanlar sakrifiye edilmiş ve elde edilen lomber füzyon segmenti manuel palpasyon, radyolojik, biyomekanik (her gruptan 2' şer hayvana), mikro bilgisayarlı tomografi (mikro-BT) cihazı ile ve histolojik olarak değerlendirilmiştir.

Bulgular: Sadece dekortikasyon yapılan grupta tüm değerlendirmelerde füzyona rastlanmadı. Grup 2' de grup 1' e göre manuel palpasyon, histolojik ve mikro-CT değerlendirmeleri ile anlamlı fark olmasına (**p<0.01**) rağmen solid füzyon oluşmadığı görüldü. Grup 3 ve Grup 4 de ise manuel palpasyonla sırasıyla %60 ve %100, radyolojik olarak sırasıyla %60 ve %92, histolojik olarak %42 ve %68.5 füzyon oranı saptandı. Mikro- BT incelemeleri ile sırasıyla %18.7 ve %33.1 kemikleşme oranları (kemik hacmi/ füzyon kitlesi) saptandı. Bu veriler ile grup 3 ve 4 arasında füzyon açısından anlamlı fark saptandı (**p<0,01**).

Sonuç: KNT' ler tek başlarına kullanıldığında spinal füzyon oluşturmada yetersiz kalsa da özellikle yüksek biyouyumlulukları ve kemik dokusuyla uyumlu eşşiz biyomekanik özellikleri nedeniyle özellikle seramik bazlı sentetik greftlerle birlikte füzyon oranlarını anlamlı olarak yükseltmektedirler.

Anahtar Kelimeler: Posterolateral füzyon, Karbon nanotüp, seramik kemik greftleri, rat , spinal füzyon

ABSTRACT

Introduction: Bone grafting is essential in posterolateral spinal fusion surgery. Although autogenous grafts have ideal graft properties, their use is limited due to the donor site comorbidities. For this reason, a variety of graft materials have been researched. The use of carbon nanotubes (CNTs) with ceramics such as hydroxyapatite (HA) has recently been used and has led to positive effects in bone tissue engineering. In this study, the effects of CNT-assisted HA-tricalcium phosphate (TCP) material on spinal fusion, which were not previously used as graft material in spinal fusion, have been investigated.

Material and methods: We operated 20 Sprague-Dawley rats to create a posterolateral fusion model between the lumbar 4-5 (L4-L5) vertebrae. Subjects were divided into four groups of five. The L4-L5 posterior arches of all the subjects were decorticated. No graft material was applied to the first group (Group 1). In the second group, we used only CNTs (Group 2),in the third group HA-TCP synthetic ceramics (Group 3) and the fourth group CNT / HA-TCP composite (Group 4). After eight weeks, all subjects were sacrificed and the obtained lomber fusion segments were assessed by manual palpation, radiological images, biomechanical tests (2 'sham animals from each group), histological evaluation and micro computerized tomography (micro-CT) device.

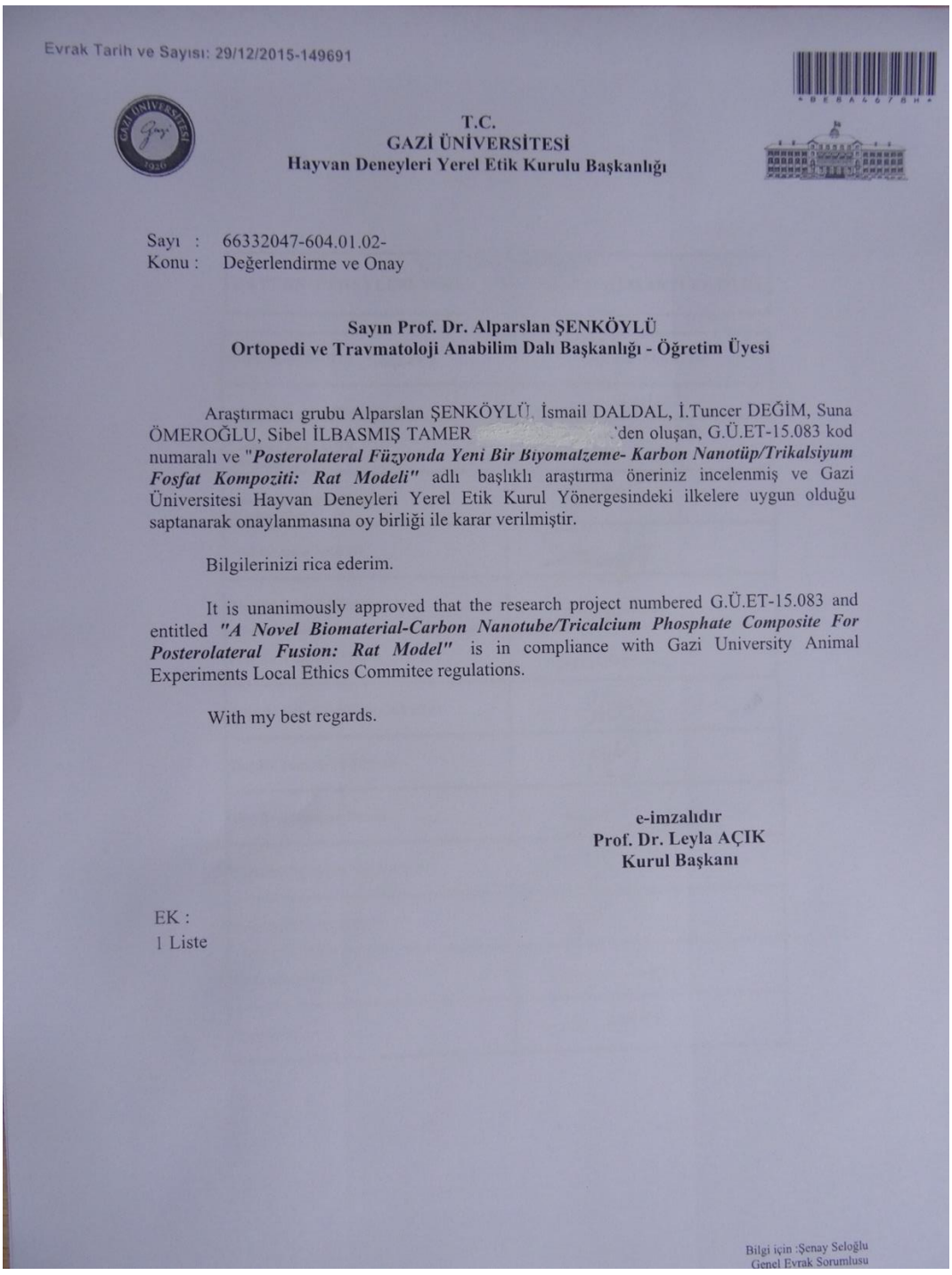
Findings: There was no fusion in the Group 1 where only decortication was done. In Group 2 (CNTs), there was no solid fusion, although there was a significant difference ($p < 0.01$) between manual palpation, histological and micro-CT scans according to Group 1. In Group 3 (HA-TCP) and Group 4 (CNT/HA-TCP), 60% and 100% fusion was detected with manual palpation, respectively. Radiologically, fusion rates were 60% and 92%, histologically 42% and 68.5%, respectively. Micro-CT scans revealed ossification rates (bone volume / fusion mass) of 18.7% and 33.1%, respectively. Significant differences were found between groups 3 and 4 in all the evaluations ($p < 0,01$).

Conclusion: Although CNTs are incapable to form spinal fusion when used alone; they significantly increase fusion rates, especially with ceramic-based synthetic grafts, due to their high biocompatibility and unique biomechanical properties compatible with bone tissue.

Key Words: Posterolateral fusion, carbon nanotube(s), ceramic bone graft substitutes, rat(s), spinal fusion

8. EKLER

8.1 Etik Kurul Onayı



Evrak Tarih ve Sayısı: 29/12/2015-149691

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Prof. Dr. Alparslan ŞENKÖYLÜ
Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Alparslan ŞENKÖYLÜ, İsmail DALDAL, İ.Tuncer DEĞİM, Suna ÖMEROĞLU, Sibel İLBASMIŞ TAMER 'den oluşan, G.Ü.ET-15.083 kod numaralı ve "***Posterolateral Füzyonda Yeni Bir Biyomalzeme- Karbon Nanotüp/Trikalsiyum Fosfat Kompoziti: Rat Modeli"*** adlı başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-15.083 and entitled ***"A Novel Biomaterial-Carbon Nanotube/Tricalcium Phosphate Composite For Posterolateral Fusion: Rat Model"*** is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Commitee regulations.

With my best regards.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Leyla AÇIK
Kurul Başkanı

EK :
1 Liste

Bilgi için :Şenay Seloğlu
Genel Evrak Sorumlusu

Şekil 33. Hayvan deneyleri yerel etik kurul onay belgesi.

9. KAYNAKLAR

1) De Boer HH. The history of bone grafts. Clin Orthop. 1988; 226:292-8.
2) Albee FH. Bone graft surgery. Clin Orthop Relat Res. 1996 Mar;(324):5-12.
3) Steinmann JC, Herkowitz HN. Pseudarthrosis of the spine. Clin Orthop. 1992;(284):80-90.
4) Boden DS. Bone growth enhancing substances for spinal fusion. In: Garfin SR, Vaccaro AR, editors. Orthopaedic knowledge update spine. 1st ed. Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 1997. p. 63-73.
5) Chun DS, Baker KC, Hsu WK. Lumbar pseudarthrosis: a review of current diagnosis and treatment. Neurosurg Focus. 2015 Oct;39(4):E10.
6) Tarpada SP, Morris MT, Burton DA. Spinal fusion surgery: A historical perspective. J Orthop. 2016;14(1):134-6.
7) Banwart JC, Asher MA, Hassanein RS. Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity: a statistical evaluation. Spine 1995;20:1055—60.
8) Van Heest A, Swiontowski M. Bone-graft substitutes. Lancet. 1999; 353(suppl 1):28—9.
9) Friedlander GE. Bone grafts. The basic science rationale for clinical applications. J Bone Joint Surg (Am). 1987 Jun; 69(5):786-790.
10) Naderi S, Zileli M. Türkiye' de ve dünyada spinal füzyonun tarihi. J Turkish Spinal Surgery. 2001. 12: 54-59.
11) Çelikbaş E. Tavşanlarda posteroleral spinal füzyon modelinde hibrid greft uygulamalarının etkinliklerinin değerlendirilmesi. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi. Uzmanlık Tezi. Denizli. 2004.
12) Shamji MF, Mroz T, Hsu W, Chutkan N. Management of Degenerative Lumbar Spinal Stenosis in the Elderly. Neurosurgery. 2015 Oct;77 Suppl 4:S68-74.
13) Dower A, Chatterji R, Swart A, Winder MJ. Surgical management of recurrent lumbar disc herniation and the role of fusion. J Clin Neurosci. 2016 Jan;23:44-50.

14) Olgun ZD, Yazıcı M. Posterior instrumentation and fusion. J Child Orthop. 2013 Feb; 7(1):69-76.
15) Panjabi M, Yamamoto I, Oxland T, Crisco J. How does posture affect coupling in the lumbar spine? Spine (Phila Pa 1976). 1989 Sep;14(9):1002-11.
16) Trobisch PD, Ducoffe AR, Lonner BS, Errico TJ. Choosing fusion levels in adolescent idiopathic scoliosis. J Am Acad Orthop Surg. 2013 Sep;21(9):519-28.
17) Chen Z, Rong L. Comparison of combined anterior – posterior approach versus posterior- only approach in treating adolescent idiopathic scoliosis: a meta-analysis. Eur Spine J. 2016 Feb;25(2):363-71.
18) Baliga S, Treon K, Craig NJ. Low Back Pain: Current Surgical Approaches.Asian Spine J. 2015 Aug;9(4):645-57.
19) Liu XY, Wang YP, Qiu GX, Weng XS, Yu B.Meta-analysis of circumferential fusion versus posterolateral fusion in lumbar spondylolisthesis. J Spinal Disord Tech. 2014 Dec;27(8):E282-93.
20) Fleege C, Rickert M, Rauschmann M. The PLIF and TLIF techniques. Indication, technique, advantages and disadvantages. Orthopade. 2015 Feb;44(2):114-23.
21) Eck JC, Hodges SD, Humphreys SC. Techniques for stimulating spinal fusion: efficacy of electricity, ultrasound, and biologic factors in achieving fusion.Am J Orthop (Belle Mead NJ). 2001 Jul;30(7):535-4.
22) Zdeblick TA.A prospective, randomized study of lumbar fusion. Preliminary results. Spine (Phila Pa 1976). 1993 Jun 15;18(8):983-91.
23) McAfee PC, Farey ID, Sutterlin CE, Gurr KR, Warden KE, Cunningham BW.The effect of spinal implant rigidity on vertebral bone density. A canine model. Spine (Phila Pa 1976). 1991 Jun;16(6 Suppl):S190-7.
24) Haeseker B. Mr. Job van Meekeren (1611-1666) and surgery of the hand. Plast Reconstr Surg. 1988 Sep;82(3):539-46.

25) "GB 248 DC/079 - Papers of Sir William Macewen, 1848-1924, surgeon, Regius Professor of Surgery, University of Glasgow, Scotland, 1892-1924" (external link)
26) V. Campana, G. Milano, E. Pagano, M. Barba, C. Cicione, G. Salonna, W. Lattanzi, G. Logroscino.Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. J Mater Sci Mater Med. 2014; 25(10): 2445–2461.
27) Bauer TW.,Muschler GF. Bone graft materials: An overview of the basic sicience. Clin Orthop Relat Res. 2000 ;(371):10-27.
28) Oryan A., Alidadi S., Moshiri A., Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. J Orthop Surg Res. 2014; 9: 18.
29) Park JB, Lee JY, Park HN, Seol YJ, Park YJ, Rhee SH, Lee SC, Kim KH, Kim TI, Lee YM, Ku Y, Rhyu IC, Han SB, Chung CP. Osteopromotion with synthetic oligopeptide-coated bovine bone mineral in vivo. J Periodontol. 2007 Jan;78(1):157-63.
30) Siebrecht MA, De Rooij PP, Arm DM, Olsson ML, Aspenberg P: Platelet concentrate increases bone ingrowth into porous hydroxyapatite. Orthopedics 2002;25(2):169-172.
31) Tsai CH, Hsu HC, Chen YJ, Lin MJ, Chen HT: Using the growth factors-enriched platelet glue in spinal fusion and its efficiency. J Spinal Disord Tech. 2009; 22(4):246-50.
32) Burchardt H. Biology of bone transplantation. Orthop Clin North Am. 1987 Apr;18(2):187-96.
33) Burchardt H. The biology of bone graft repair. Clin Orthop Relat Res. 1983 Apr;(174):28-42.
34) Glowacki J. Demineralized Bone and BMPs: Basic Science and Clinical Utility. J Oral Maxillofac Surg. 2015 Dec;73(12 Suppl):S126-31.
35) Tuchman A, Brodke DS, Youssef JA, Meisel HJ, Dettori JR, Park JB, Yoon ST, Wang JC. Iliac Crest Bone Graft versus Local Autograft or Allograft for Lumbar Spinal Fusion: A Systematic Review. Global Spine J.

2016 Sep;6(6):592-606.

36) Delawi D, Dhert WJ, Castelein RM, Verbout AJ, Oner FC: The incidence of donor site pain after bone graft harvesting from the posterior iliac crest may be overestimated: A study on spine fracture patients. Spine (Phila Pa 1976) 2007;32(17):1865-1868.

37) Howard JM, Glassman SD, Carreon LY: Posterior iliac crest pain after posterolateral fusion with or without iliac crest graft harvest. *Spine J* 2011; 11(6):534-537.

38) Singh R, Singh D, Singh A. Radiation sterilization of tissue allografts: A review. World J Radiol. 2016 Apr 28;8(4):355-69.

39) Zamborsky R, Svec A, Bohac M, Kilian M, Kokavec M. Infection in Bone Allograft Transplants. Exp Clin Transplant. 2016 Oct;14(5):484-490.

40) Aurori BF, Weierman RJ, Lowell HA, Nadel CI, Parsons JR.Pseudarthrosis after spinal fusion for scoliosis. A comparison of autogeneic and allogeneic bone grafts. Clin Orthop Relat Res. 1985 Oct;(199):153-8.

41) Gibson S, McLeod I, Wardlaw D, Urbaniak S: Allograft versus autograft in instrumented posterolateral lumbar spinal fusion: A randomized control trial. Spine (Phila Pa 1976) 2002;27(15): 1599-1603.

42) Samartzis D, Shen FH, Matthews DK, Yoon ST, Goldberg EJ, An HS: Comparison of allograft to autograft in multilevel anterior cervical discectomy and fusion with rigid plate fixation. Spine J 2003;3(6):451-459.

43) Mroz TE, Joyce MJ, Lieberman IH, Steinmetz MP, Benzel EC, Wang JC: The use of allograft bone in spine surgery: Is it safe? Spine J 2009;9(4):303-308.

44) Block JE. The role and effectiveness of bone marrow in osseous regeneration. Med Hypotheses. 2005;65(4):740-7.

45) Cooke FW. Ceramics in orthopedic surgery. Clin Orthop Relat Res. 1992 Mar;(276):135-46.

46) Arner JW, Daffner SD. Bone graft extenders and substitutes in the thoracolumbar spine. Am J Orthop. 2012 May;41(5):230-5.

47) Thalgott JS, Klezl Z, Timlin M, Giuffre JM. Anterior lumbar interbody fusion with processed sea coral (coralline hydroxyapatite) as part of a circumferential fusion. Spine (Phila Pa 1976). 2002 Dec 15;27(24):E518-25.
48) Mashoof AA, Siddiqui SA, Otero M, Tucci JJ. Supplementation of autogenous bone graft with coralline hydroxyapatite in posterior spine fusion for idiopathic adolescent scoliosis. Orthopedics. 2002 Oct;25(10):1073-6.
49) Begam H, Nandi SK, Kundu B, Chanda A. Strategies for delivering bone morphogenetic protein for bone healing. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2017 Jan 1;70(Pt 1):856-869.
50) Gupta A, Kukkar N, Sharif K, Main BJ, Albers CE, El-Amin SF. Bone graft substitutes for spine fusion: A brief review. World J Orthop. 2015 Jul 18;6(6):449-56.
51) Venkatesan J, Pallela R, Kim SK.Applications of carbon nanomaterials in bone tissue engineering.J Biomed Nanotechnol. 2014 Oct;10(10):3105-23.
52) Lijima S. "Helical microtubules of graphitic carbon" Nature. 1991;354:56-58.
53) Bianco A., Prato M. Can carbon nanotubes be considered useful tools for biological application? Advance Materials. 2003;15: 1765-68.
54) Smart SK., Cassady AI., Lu GQ., Martin DJ. The biocompatibility of carbon nanotubes. Toxicology of Carbon Nanomaterials. 2006; 44:1034-47.
55) Wong BS, Yoong SL, Jagusiak A, Panczyk T, Ho HK, Ang WH, Pastorin G. Carbon nanotubes for delivery of small molecule drugs. Adv Drug Deliv Rev. 2013 Dec;65(15):1964-2015.
56) Pantarotto D., Briand JP., Prato M., Bianco A. Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes. Chemical Communications. 2004; 1: 16-17.
57) Andersen AJ., Windschiegl B., Ilbasmis-Tamer S., Degim IT., Hunter AC., Andresen TL., Moghimi SM.Complement activation by PEG-functionalized multi-walled carbon nanotubes is independent of PEG

molecular mass and surface density. Nanomedicine. 2013 May;9(4):469-73.

58) Tonelli FM, Goulart VA, Gomes KN, Ladeira MS, Santos AK, Lorençon E, Ladeira LO, Resende RR. Graphene-based nanomaterials: biological and medical applications and toxicity. Nanomedicine (Lond). 2015;10(15):2423-50.

59) Dong J, Ma Q. Advances in mechanisms and signaling pathways of carbon nanotube toxicity. Nanotoxicology. 2015;9(5):658-76.

60) Bhattacharya K, Mukherjee SP, Gallud A, Burkert SC, Bistarelli S, Bellucci S, Bottoni M., Star A., Fadeel B. Biological interactions of carbon-based nanomaterials: From coronation to degradation. Nanomedicine. 2016 Feb;12(2):333-51.

61) Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, Mine T, Kondo H, Takeuchi T, Matsumoto M, Fukushima S. Lung carcinogenicity of inhaled multi-walled carbon nanotube in rats. Part Fibre Toxicol. 2016 Oct 13;13(1):53.

62) Costa PM, Bourgognon M, Wang JT, Al-Jamal KT. Functionalised carbon nanotubes: From intracellular uptake and cell-related toxicity to systemic brain delivery. J Control Release. 2016 Nov 10;241:200-219.

63) Wiltse LL, Spencer CW. New uses and refinements of the paraspinal approach to the lumbar spine. Spine (Phila Pa 1976). 1988 Jun;13(6):696-706.

64) Vialle R, Wicart P, Drain O, Dubousset J, Court C. The Wiltse paraspinal approach to the lumbar spine revisited: an anatomic study. Clin Orthop Relat Res. 2006 Apr;445:175-80.

65) Drespe IH, Polzhofer GK, Turner AS, Grauer JN. Animal models for spinal fusion. Spine J. 2005 Nov-Dec;5(6 Suppl):209S-216S. Review.

66) Shin DA., Yang BM., Tae G., Kim YH., Kim HS., Kim HI. Enhanced spinal fusion using a biodegradable porous mesh container in a rat posterolateral spinal fusion model. Spine J. 2014 Mar 1;14(3):408-15.

67) Salamon ML., Althausen PL., Gupta MC., Laubach J. The effects of BMP-7 in a rat posterolateral intertransverse process fusion model. J Spinal Disord Tech. 2003 Feb;16(1):90-5.
68) Histopathologic Technic and Practical Histochemistry, 3rd Edition, McGraw-Hill Book Co., New York.
69) Theory and Practice of Histotechnology, Edited by DC Sheehen and BB Hrapchak, 2rd Edition, Mosby, St. Louis, (MO), 1980.
70) Immunocytochemical Methods and Protocols, 2rd Edition. Edited by Lorette C Javois. Humana Press, Totowa, New Jersey.
71) Emery SE., Brazinski MS., Koka A., Bensusan JS., Stevenson S. The biological and biomechanical effects of irradiation on anterior spinal bone grafts in a canine model. J Bone Joint Surg (Am). 1994; 76:540-8.
72) Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. Injury.2005 Nov;36 Suppl 3:S20-7.
73) Koerner JD, Yalamanchili P, Munoz W, Uko L, Chaudhary SB, Lin SS, Vives MJ. The effects of local insulin application to lumbar spinal fusions in a rat model. Spine J. 2013 Jan;13(1):22-31.
74) Grauer JN, Bomback DA, Lugo R, Troiano NW, Patel TC, Friedlaender GE. Posterolateral lumbar fusions in athymic rats: characterization of a model. Spine J. 2004 Jun;4(3):281-6.
75) Ishikawa S, Shin HD, Bowen JR, Cummings RJ. Is it necessary to decorticate segmentally instrumented spines to achieve fusion? Spine (Phila Pa 1976). 1994 Aug 1;19(15):1686-90.
76) Schimandle JH, Boden SD. Spine update. The use of animal models to study spinal fusion. Spine (Phila Pa 1976). 1994 Sep 1;19(17):1998-2006.
77) Grabowski G, Cornett CA. Bone graft and bone graft substitutes in spine surgery: current concepts and controversies. J Am Acad Orthop Surg. 2013 Jan;21(1):51-60.
78) Ohtori S, Suzuki M, Koshi T. et al. Single-level instrumented posterolateral fusion of the lumbar spine with a local bone graft versus an iliac crest bone

graft: a prospective, randomized study with a 2-year follow-up. Eur Spine J 2011;20(4):635–639.

79) Sengupta DK, Truumees E, Patel CK. Outcome of local bone versus autogenous iliac crest bone graft in the instrumented posterolateral fusion of the lumbar spine. Spine (Phila Pa 1976) 2006;31(9):985–991

80) Berven S, Tay BK, Kleinstueck FS, Bradford DS. Clinical applications of bone graft substitutes in spine surgery: consideration of mineralized and demineralized preparations and growth factor supplementation. Eur Spine J 2001;10(Suppl 2):S169–S177

81) Khan SN, Fraser JF, Sandhu HS, Cammisa FP Jr, Girardi FP, Lane JM. Use of osteopromotive growth factors, demineralized bone matrix, and ceramics to enhance spinal fusion. J Am Acad Orthop Surg 2005;13(2):129–137

82) Gazdag AR, Lane JM, Glaser D, Forster RA. Alternatives to autogenous bone graft: efficacy and indications. J Am Acad Orthop Surg 1995;3(1):1–8

83) Dai LY, Jiang LS. Single-level instrumented posterolateral fusion of lumbar spine with beta-tricalcium phosphate versus autograft: prospective, randomized study with 3-year follow-up. Spine (Phila Pa 1976) 2008;33(12):1299-1304.

84) Epstein NE: A preliminary study of the efficacy of Beta Tricalcium Phosphate as a bone expander for instrumented posterolateral lumbar fusions. *J Spinal Disord Tech* 2006;19(6):424-429.

85) Korovessis P, Koureas G, Zacharatos S, Papazisis Z, Lambiris E: Correlative radiological, self-assessment and clinical analysis of evolution in instrumented dorsal and lateral fusion for degenerative lumbar spine disease: Autograft versus coralline hydroxyapatite. *Eur Spine J* 2005;14(7):630-638.

86) Drespe IH, Polzhofer GK, Turner AS, Grauer JN.Spine J. Animal models for spinal fusion. 2005 Nov-Dec;5(6 Suppl):209S-216S. Review.

87) Ragni P, Lindholm TS. Interaction of allogeneic demineralized bone matrix and porous hydroxyapatite bioceramics in lumbar interbody fusion in

rabbits. Clin Orthop Relat Res. 1991 Nov;(272):292-9.

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

89) Nickoli MS., Hsu WK. Ceramic-Based Bone Grafts as a Bone Graft Extender for Lumbar Spine Arthrodesis: A Systematic Review. Global Spine J. 2014;4:211-216.

90) Mukherjee S., Nandi SK., Kundu B., Chanda A., Sen S., Das PK. Enhanced bone regeneration with carbon nanotube reinforced hydroxyapatite in animal model. J Mech Behav Biomed Mater. 2016 Jul;60:243-55.

91) Mikael PE, Amini AR, Basu J, Josefina Arellano-Jimenez M, Laurencin CT, Sanders MM., Barry Carter C, Nukavarapu SP. Functionalized carbon nanotube reinforced scaffolds for bone regenerative engineering: fabrication, in vitro and in vivo evaluation. Biomed Mater. 2014 Jun;9(3):035001.

92) Cancian G, Tozzi G, Hussain AA, De Mori A, Roldo M. Carbon nanotubes play an important role in the spatial arrangement of calcium deposits in hydrogels for bone regeneration. J Mater Sci Mater Med. 2016 Aug;27(8):126.

93) PourAkbar Saffar K., Sudak LJ., Federico S. A biomechanical evaluation of CNT-grown bone. J Biomed Mater Res A. 2016 Feb;104(2):465-75.

94) Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. J Bone Miner Res. 2010 Jul;25(7):1468-86.

95) Yamaguchi T, Inoue N, Sah RL, Lee YP, Taborek AP, Williams GM. Micro-computed tomography-based three-dimensional kinematic analysis during lateral bending for spinal fusion assessment in a rat posterolateral lumbar fusion model. Tissue Eng Part C Methods. 2014 Jul;20(7):578-87.

96) Jaumard NV., Leung J., Gokhale AJ, Guarino BB., Welch WC., Winkelstein BA. Relevant Anatomic and Morphological Measurements of

the Rat Spine: Considerations for Rodent Models of Human Spine Trauma. Spine (Phila Pa 1976). 2015 Oct 15;40(20):E1084-92.

97) Morimoto T., Kaito T., Kashii M., Matsuo Y., Sugiura T., Iwasaki M., Yoshikawa H. Effect of Intermittent Administration of Teriparatide (Parathyroid Hormone 1-34) on Bone Morphogenetic Protein-Induced Bone Formation in a Rat Model of Spinal Fusion. *J Bone Joint Surg Am*, 2014 Jul 02; 96 (13): e107.